

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ «КИЇВСЬКИЙ  
ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
“НАУКОВО - ПРАКТИЧНИЙ МЕДИЧНИЙ ЦЕНТР ДИТЯЧОЇ  
КАРДІОЛОГІЇ ТА КАРДІОХІРУРГІЇ”

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**СОКОЛ АНАТОЛІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ**

УДК: 57.085.2:573.6:611.126

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ОТРИМАННЯ БІОІМПЛАНТУ ДЛЯ**  
**ВИКОРИСТАННЯ У КАРДІОХІРУРГІЇ**

**03.00.20 - «Біотехнологія»**

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ А.А. Сокол

Науковий керівник:

Галкін Олександр Юрійович, доктор біологічних наук, професор

Київ-2021

## АНОТАЦІЯ

**Сокол А.А. Біотехнологічні основи отримання біоімпланту для використання у кардіохірургії** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, 2021.

**Актуальність теми дослідження.** На сьогодні серцево-судинні захворювання є основними причинами смертності у світі. Згідно даних Всесвітньої організації охорони здоров'я, хвороби серця забирають понад 17 мільйонів життів щороку, що складає 31% усіх випадків смертності. В Україні дана група захворювань є причиною 67% усіх летальних випадків серед дорослого населення та 30 % загальної смертності серед новонароджених. Щорічно майже 25 тис. українців потребують проведення процедур ургентного коронарного стентування у випадках гострого інфаркту міокарда. Вроджені вади серця (ВВС) зустрічаються з частотою близько 9%. На сьогоднішній день кардіохірургічні операції виконуються майже при всіх ВВС, де в більшості випадків проводиться повна анатомічна корекція із використанням штучних імплантів. Загальна післяопераційна летальність при даних оперативних втручаннях в провідних клініках світу становить менше 3%. В той час як в ДУ «Науково-практичному медичному центрі дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України» за даними 2019 року цей показник складав 1,3% від всіх корекції ВВС у пацієнтів різного віку. Однак використання штучних протезів має низку недоліків, що значно погіршують якість життя пацієнтів у післяопераційний період. Близько третини прооперованих потребують повторних хірургічних втручань у різні терміни у віддаленому періоді. Це пов'язано з тим, що дитячий організм має унікальну здатність рости, а матеріали, які використовуються на сьогоднішній день в

кардіохірургії, на жаль, не ростуть разом з пацієнтом. Так, при імплантації кондуїту в легеневу позицію на перших місяцях життя до досягнення дорослого віку пацієнту буде проведено 2-3 операції по заміні протезу в легеневій позиції на більший за розміром. Зазвичай пацієнтам необхідно проводити пожиттєву антикоагуляційну терапію. Перспективним напрямком в подоланні вищезазначених проблем може бути використання біологічних імплантів. Проте і їх використання обумовлює низку невирішених проблем, таких як повна або часткова біодеградація та кальцифікація після імплантації.

У світовій медичній практиці все більше використовують біоімпланти виготовленні із ксенотканин, наприклад із перикарду свиней, коней, великої рогатої худоби (ВРХ). За еластичністю такий матеріал близький до тканин людини. Для отримання такого імпланту нативний матеріал піддається біотехнологічній трансформації – децелюляризації, за якої відбувається повна елімінація клітин донора і очистка від антигенних молекул зі збереженням структури позаклітинного матриксу. Отже, тканинна інженерія виконує своє завдання по створенню *in vitro* таких тканинних компонентів, імплантація яких в організмі реципієнта призводить до регенерації пошкоджених або нефункціональних тканин та органів за рахунок контролю стимуляції клітин-мішеней. Передбачається, що організм сам себе виліковує за рахунок доставки в необхідну ділянку молекулярних сигналів, клітин і/або підтримуючих конструкцій. Засобами доставки цих клітин являються скафолди, очищенні позаклітинні структури біоімпланту, що виконують роль матриці на якій відбувається трансформація клітин в необхідну тканину з формуванням визначеної конструкції.

На сьогодні біотехнологічні схеми із використанням різних видів ксенотканин успішно застосовують для створення органних і тканинних імплантів, зокрема клапанів серця, міокарда, перикарда, судин, легень, підшлункової залози, нирок, печінки, молочних залоз. Децелюляризований

позаклітинний матрикс (ДПМ), виготовлений із ксеноперикарду ВРХ, є перспективним біоматеріалом для відновлення серцево-судинної тканини, оскільки структура колаген–еластинового компоненту каркасу задовільно зберігається, а антигенні молекули належним чином елімінуються і тим самим знижується антигенність такого матеріалу. Широке застосування даний матеріал знайшов в серцево-судинній хірургії, його використовують для корекції набутих і вроджених вад серця (закриття дефектів міжпередсердної і міжшлуночкової перегородок); створення штучних трикуспідального, мітрального і аортального клапанів серця; протезування та пластики судин, стулок клапанів серця; профілактики спайкових процесів у середостінні; біопротезування і пластики магістральних судин (пластика висхідної аорти); пластики кореня аорти. Оскільки децелюляризований перикард має безліч властивостей, необхідних для використання в техніці заміни клапанної тканини, включаючи адекватні механічні властивості, мінімальну цитотоксичність, чудовий потенціал репопуляції клітин та схильність до ремоделювання матриксу.

На жаль, на сьогодні як в Україні, так і в Світі, немає ідеального біоматеріалу, який би відповідав усім вимогам кардіохірургії і володів атромбогенністю, еластичністю, довговічністю, мінімальною антигенністю, відсутністю імуногенності і цитотоксичності, та міцністю, тобто був за своїми властивостями близьким до характеристик природних тканин. Тому продовжується пошук, розробка та вдосконалення методів біотехнологічної трансформації ксенотканини, які б могли забезпечити отримання високоякісного матеріалу.

Розробка нових біологічних матеріалів і біоімплантів є відносно новим науково-практичним напрямком, який інтенсивно розвивається на межі багатьох наук: біотехнології, медицини, хімії, біохімії, біофізики, гістології, генетики, імунології. Біотехнологічна розробка біосумісних матеріалів для кардіохірургії дозволить значно покращити якість життя дітей з ВВС,



зменшити кількість повторних кардіохірургічних операцій, знизити вартість лікування.

**Метою роботи** було обґрунтування біотехнології отримання тканинних імплантів на основі перикарду ВРХ.

Для досягнення поставленої мети необхідно було розв'язати такі **задачі**:

1. Провести експериментальну оцінку відтворюваності та ефективності існуючих технологій отримання тканинних імплантів, визначити їх критичні недоліки та теоретично обґрунтувати оригінальні модифікації технологій, що мають забезпечувати кращі показники якості, безпечності та біосумісності імплантів.

2. Провести порівняльні дослідження різних методів децелюляризації перикарда ВРХ і визначити характер морфологічних змін біоматеріалу після впливу іонних і неіонних детергентів у процесі децелюляризації (в умовах *in vitro*).

3. Дослідити ефективність очистки децелюляризованого позаклітинного матриксу від донорських клітин.

4. Вивчити характер зміни пружно-міцнісних властивостей перикарда в процесі біотехнологічної трансформації.

5. Визначити цитотоксичний вплив децелюляризованого позаклітинного матриксу на культуру клітин людини (в умовах *in vitro*).

6. Дослідити динаміку тканинної реакції на ксенотрансплантацію імпланту, отриманого різними технологіями (в умовах *in vivo*).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше в Україні розроблено оригінальну добре відтворювану біотехнологічну схему отримання ксенотрансплантату для використання в кардіохірургії на основі децелюляризованого матриксу перикарда ВРХ. Експериментально доведено високу ефективність розробленої технології, безпечність отриманого біоматеріалу *in vitro* та його біосумісність *in vivo*.

Розроблено схему оцінки якості та безпечності ксеногенних біоматеріалів, призначених для трансплантації у кардіохірургічній практиці, яка передбачає визначення ступеню очистки від антигенних молекул, вивчення біомеханічних властивостей, дослідження на цитотоксичність та біосумісності.

Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи створення біосумісних ксеногенних матеріалів (трансплантатів) для використання у кардіохірургії.

**Практичне значення отриманих результатів.** У результаті проведених експериментальних досліджень було відпрацьовано відтворювані методики оцінки якості біоімплантів для кардіохірургії, а також методи їх біологічного оцінювання згідно з вимогами стандартів серії ISO 10993 «Medical devices. Biological evaluation of medical devices». Отриманий за розробленою технологією біоімплант характеризувався задовільними біомеханічними властивостями, антигенністю та відсутністю цитотоксичного впливу *in vitro*. Висока біосумісність отриманого імпланту, продемонстрована на експериментальних моделях *in vivo* (відсутність імуногенних реакцій, заміщення скафолду розростаючою незрілою сполучною тканиною, посилена васкуляризація), є підставою для проведення клінічних досліджень і подальшої сертифікації біоімпланту (Акт впровадження науково-методичної розробки від 18.12.2020 р., ДУ «Науково практичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України»). Інформаційний лист № 226-2020 «Біотехнологічна схема отримання біоімпланту із перикарду великої рогатої худоби для потреб кардіохірургії» використовується органом з оцінки відповідності ТОВ «Імпрув Медікел» при оцінці відповідності медичних виробів, що регламентується постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 753 «Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів» (Акт впровадження інформаційного листа від 18.12.2020 р.). Результати роботи впроваджено у

викладання курсів «Біоматеріали і біотехнології» та «Клітинна, тканинна та біофармацевтична інженерія» для студентів спеціальності 163 Біомедична інженерія на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського (довідка про використання результатів дисертаційної роботи від 14.12.2020 р.).

**Публікація матеріалів.** Основні положення роботи викладені в 10 наукових працях, у т.ч. у 5 статтях у наукових фахових виданнях (2 статті у виданнях України, що включені до міжнародної наукометричної бази Scopus, та 1 стаття у науковому виданні країни, що входить до Європейського Союзу), 5 тезах конгресів, з'їздів, наукових конференцій.

**Ключові слова:** децелюляризація, перикард великої рогатої худоби, біоімплант, тканинна інженерія

## ANNOTATION

**Sokol A.A. Biotechnological bases of bioimplant production for cardiac surgery. - Manuscript.**

Thesis for the scientific degree of a Candidate of Biological Sciences in the specialty 03.00.20 - Biotechnology. - National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Kyiv, 2021.

**Relevance of the research topic.** Today, cardiovascular disease is the leading cause of death in the world. According to the World Health Organization, heart disease kills more than 17 million people each year, accounting for 31% of all deaths. In Ukraine, this group of diseases is the cause of 67% of all deaths among adults and 30% of total mortality among newborns. Every year, almost 25,000 Ukrainians need urgent coronary stenting procedures in cases of acute myocardial infarction.

Congenital heart defects (CHD) occur with a frequency of approximately 9%. To date, cardiac surgery is performed in almost all CHDs, where in most cases a complete anatomical correction is performed using artificial implants. The total postoperative mortality rate from these surgeries in the world's leading clinics is less than 3%, while in the State Institution "Scientific and Practical Medical Center of Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery of the Ministry of Health of Ukraine," according to 2019, this figure was 1.3% of all CHD corrections in patients of different ages. However, the use of artificial prostheses has several disadvantages that significantly impair the quality of life of patients throughout the postoperative period. About a third of operated patients require repeated surgery at various times in the long term. This is because a child's body has a unique ability to grow, and the materials used today in cardiac surgery, unfortunately, do not grow with the patient. Thus, when implanting a conduit in the pulmonary position in the first months of life before reaching adulthood, the patient will undergo 2-3 operations to replace the prosthesis in the pulmonary position to a larger size and patients usually require lifelong anticoagulation therapy. A promising direction in

overcoming the above problems may be the use of biological implants. However, their application causes several unresolved issues, such as complete or partial biodegradation and calcification after implantation.

In world medical practice, bioimplants made of xenotissue, such as from the pericardium of pigs, horses and cattle, have an elasticity of material close to human tissues and are increasingly used. To obtain such an implant, the native material is subjected to biotechnological transformation - decellularization, which is the complete elimination of donor cells and purification from antigenic molecules while preserving the structure of the extracellular matrix. Thus, tissue engineering performs its task in creating *in vitro* such tissue components with the implantation into the recipient's body leading to the regeneration of damaged or non-functional tissues and organs by controlling the stimulation of target cells. It is assumed that the body heals itself by delivering of molecular signals, cells and/or supporting structures into the desired area. The means of delivery of these cells are scaffolds, purified extracellular structures of the bioimplant, which act as a matrix on which the cells transform into the desired tissue with the certain structure formation.

Today, biotechnological schemes for producing scaffolds are successfully used to create organ and tissue implants, including heart valves, myocardium, pericardium, blood vessels, lungs, pancreas, kidneys, liver and breast. Decellularized extracellular matrix (DEM), made from bovine xenopericardium, is a promising biomaterial for the restoration of cardiovascular tissue, since the structure of the collagen-elastin component of the scaffold is satisfactorily preserved, and antigenic molecules are properly eliminated, thereby reducing the antigenicity of such material. This material is commonly preferred in cardiovascular surgery, and it is used for the correction of acquired and congenital heart defects (closure of atrial and interventricular septal defects); creation of artificial tricuspid, mitral and aortic heart valves; bioprosthetics and plasty of major vessels (plasty of the ascending aorta); aortic root surgery. The decellularized pericardium has many properties required for use in the valve

replacement technique, including adequate mechanical properties, minimal cytotoxicity, excellent cell repopulation potential, and a tendency to matrix remodeling.

Unfortunately, there is no ideal biomaterial in Ukraine and in the World, that would be in its own properties close to those of natural tissues and meet all the requirements of cardiac surgery, that is possessing atrombogenicity, elasticity, durability, low antigenicity and lack of immunogenicity and cytotoxicity. Therefore, the research, development and improvement of xenotissue biotechnological transformation techniques providing high-quality material continues.

The development of new biological materials and bioimplants is a relatively new scientific and practical direction, which is progressing on the edge of many sciences, including: biotechnology, medicine, chemistry, biochemistry, biophysics, histology, genetics, and immunology. Biotechnological development of biocompatible materials for cardiac surgery will significantly improve the quality of life of children with CHD, minimize the number of repeated cardiac surgeries and lower the treatment cost.

**The aim** of this work was to scientifically substantiate the biotechnology of obtaining tissue implants based on the bovine pericardium.

To achieve this goal, it was necessary to solve the following tasks:

1. Conduct an experimental assessment of the reproducibility and effectiveness of existing technologies for tissue implants, identify their critical shortcomings and theoretically justify the original technological modifications providing better indicators of quality, safety and the biocompatibility of implants.
2. Conduct comparative studies of the different methods of the bovine pericardium decellularization and determine the nature of morphological changes in the biomaterial after exposure to ionic and nonionic detergents during the decelularization (*in vitro*).

3. To investigate the purification efficiency of decellularized extracellular matrix from donor cells.
4. To study the nature of changes in the pericardium elastic properties during the biotechnological transformation.
5. To determine the cytotoxic effect of decellularized extracellular matrix on human cells (*in vitro*).
6. Investigate the dynamics of the tissue response to xenotransplantation of the implants obtained by different technologies (*in vivo*).

**Scientific novelty of the obtained results.** For the first time in Ukraine an original well-reproduced biotechnological scheme for obtaining a xenograft for use in cardiac surgery based on a decellularized matrix of bovine pericardium has been developed. The high efficiency of the developed technology, the safety of the obtained biomaterial *in vitro* and its biocompatibility *in vivo* have been experimentally proved.

A scheme for assessing the quality and safety of xenogenic biomaterials intended for transplantation in cardiac surgery has been developed, which involves the determination of the degree of purification from antigenic molecules, the study of biomechanical properties, cytotoxicity and biocompatibility.

The results of the work were supplemented by modern scientific and methodological approaches for the production of biocompatible xenogeneic materials (grafts) for use in cardiac surgery.

**The practical significance of the results.** As a result of conducted experimental research the reproducible methods of quality assessment of bioimplant for cardiac surgery, and methods of their biological evaluation according to ISO standard requirements 10993 “Medical devices. Biological evaluation of medical devices”. The bioimplant obtained by the developed technology was characterized by satisfactory biomechanical properties, antigenicity and absence of cytotoxic effect *in vitro*. The high biocompatibility of the obtained implant demonstrated in experimental models *in vivo*, namely, the

absence of immunogenic reactions, replacement of scaffold with growing immature connective tissue, enhanced vascularization, is the basis for clinical trials and further certification of the bioimplants (Act for the introduction of scientific and methodological development of 12.18.2020, SI "Scientific and Practical Center for Pediatric Cardiology and Cardiac Surgery of the Ministry of Health of Ukraine"). Information letter № 226-2020 "Biotechnological scheme of bioimplant obtaining from cattle pericardium for cardiac surgery" is used by the conformity assessment body of Improve Medical LLC in assessing the conformity of medical devices, which is regulated by the Resolution of the Cabinet of Ministers of Ukraine from October 2, 2013 № "On approval of the Technical Regulation on medical devices" (Act of implementation of the information letter dated 18.12.2020). The results of the work are introduced in the teaching of courses "Biomaterials and Biotechnologies" and "Cell, Tissue and Biopharmaceutical Engineering" for students majoring in 163 Biomedical Engineering at the Department of Translational Medical Bioengineering, Igor Sikorsky KPI. (Information on the use of the results of the dissertation from 14.12.2020).

**Publication of materials.** The main provisions of the work are set out in 10 scientific papers, including 5 articles in scientific journals (2 articles in publications of Ukraine included in the international scientometric base Scopus, and 1 article in a scientific publication of a European Union country), 5 abstracts of congresses and conferences.

**Key words:** bovine pericardium, decelularization, bioimplant, tissue engineering.



## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Статті у фахових наукових виданнях України та інших країн*

1. Sokol A.A. A state of the “heart”: application of bioengineered materials for cardiac surgery / A.A. Sokol, D.A. Grekov, G.I. Yemets, A.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, A.A. Dovghaliuk, O.V. Telehuzova, I.M. Yemets // Journal of Education, Health and Sports. – 2020. – Vol. 10, № 9. – P. 927–936. (Республіка Польща). (Входить до міжнародних баз даних: ERIH PLUS, Index Copernicus, InfoBase, PBN Polska Bibliografia Naukowa, Arianta тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*
2. Sokol A.A. Comparison of bovine pericardium decellularization protocols for production of biomaterial for cardiac surgery / A.A. Sokol, D.A. Grekov, G.I. Yemets, A.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, A.A. Dovghaliuk, O.V. Telehuzova, I.M. Yemets // Biopolymers and Cell. – 2020. – Vol. 36, № 5. – P. 392–403. (Входить до міжнародних баз даних: **Scopus**, SJR, BIOSIS Previews, DOAJ, EBSCO, Medical Journal Links тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, підготовка до друку.*
3. Sokol A.A. The efficiency of decellularization of bovine pericardium of different concentration of sodium dodecyl sulfate / A.A. Sokol, D.A. Grekov G.I. Yemets, O.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, A. A. Dovghaliuk, N.M. Rudenko, I.M. Yemets // Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2020. – Vol. 4, № 4. – P. 189–198. (Входить до міжнародних баз даних: DOAJ; ROAD; HINARI; Chemical Abstracts Service тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*
4. Sokol A.A. Biocompatibility analysis of the decellularized bovine pericardium / A.A. Sokol, D.A. Grekov, G.I. Yemets, O.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, I.M. Yemets // Cell and Organ Transplantology. – 2020. – Vol. 8, № 2. – P. 112–116. (Входить до міжнародних баз даних: **Scopus**, Google Scholar тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні*

*дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

5. Sokol A.A. Prospects for application of bovine pericardial scaffold for cardiac surgery / A.A. Sokol, D.A. Grekov, G.I. Yemets, O.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, A.A. Dovgaliuk, N.M. Rudenko, I.M. Yemets // *Biotechnologia Acta*. – 2020. – Vol. 13, № 6. – P. 41–49. (Входить до міжнародних баз даних: Index Copernicus, DOAJ, Google Scholar, CAS, OAJI, JournalTOCs, GIGA Information Center, ResearchBib, ASI, 22 WordCat, EuroPub тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

#### ***Тези доповідей***

6. Sokol A.A. Biomechanical properties of scaffolds for cardiac repair and regeneration / A.A. Sokol // *Medical Physics – Current State, Issue, Development Directions. New Technologies: IX International Conference, September 23–25, 2020, Kyiv, Ukraine*. – P. 148–152. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

7. Sokol A.A. Features of manufacture of decellularized scaffolds for use in cardiac surgery / A.A. Sokol, D.A. Grekov, O.Yu. Galkin, G.I. Yemets, N.V. Shchotkina, I.M. Yemets // *Actual Problem of Biochemistry, Cell Biology and Physiology: V International Scientific Conference, October 15–16, 2020, Dnipro, Ukraine*. – P. 121–123. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

8. Сокол А.А. Вплив концентрації sodium dodecyl sulfate на цитотоксичні властивості екстракорпорального матриксу / А.А. Сокол // *Актуальні питання фармакології та медичної біохімії: Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження проф. О.О. Столярчука, 15–16 жовтня 2020, Вінниця, Україна*. – С. 58–60. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

9. Sokol A.A. Experience in the development and manufacture of the universal biomaterial for using in cardiac surgery / A.A. Sokol // Congenital Heart Diseases: 15th Annual Ukrainian Forum, October 22–23, 2020, Kyiv, Ukraine. – P. 6. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*
10. Сокол А.А. Біоімпланти з ксенотканини для хірургічної корекції патологічних змін в органах серцево-судинної системи / А. А. Сокол // Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція: III Науково-практична internet-конференція з міжнародною участю, 19 листопада 2020, Харків, Україна. – С. 273–274. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....</b>	<b>18</b>
<b>ВСТУП .....</b>	<b>19</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>27</b>
1.1 Сучасні потреби кардіохірургії у використанні імплантів для корекції вад серця .....	27
1.2 Класифікація імплантів, що використовуються у кардіохірургії .....	30
1.3 Способи виготовлення біоімплантів для кардіохірургії .....	35
1.4 Різновид біоматеріалу для виготовлення кардіохірургічних імплантів ...	42
1.5 Особливості використання перикарду великої рогатої худоби для виготовлення кардіоімплантів .....	44
1.6 Вимоги до тканин ксенотрансплантанту для його використання у кардіохірургії .....	47
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....</b>	<b>52</b>
2.1 Матеріали і методи досліджень .....	52
2.1.1. Перикард великої рогатої худоби .....	52
2.1.2. Культури клітин .....	54
2.1.3. Лабораторні/експериментальні тварини .....	54
2.2. Технологія виготовлення децелюляризованого матриксу.....	55
2.2.1. Визначення/вимірювання (дослідження) механічних властивостей децелюляризованого матриксу.....	57
2.2.2. Фарбування препаратів гематоксилін еозином, Конго та триколором по Масону.....	60
2.2.3. Фарбування за методом DAPI .....	62
2.2.4. Спектрофлуометричний метод визначення концентрації нуклеїнових кислот .....	62
2.3. Стабілізація децелюляризованого матриксу методом зшивання NHS/EDC.....	63
2.4. Визначення цитотоксичності .....	63

2.5. Визначення біосумісності матеріалів .....	64
2.6. Методи математичного аналізу та статистичної обробки отриманих даних.....	67
<b>РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ОСНОВ</b>	
<b>ВИГОТОВЛЕННЯ БІОІМПЛАНТУ .....</b>	<b>68</b>
3.1. Порівняльна оцінка методів/способів отримання децелюляризованого матриксу .....	68
3.1.1. Характеристика біомеханічних властивостей децелюляризованого матриксу .....	77
3.1.2. Оцінка якості процесу децелюляризації зразків перикарду великої рогатої худоби .....	80
3.1.2.1. Використання методу фарбування гематоксилін еозином для виявлення клітинних компонентів матеріалу у зразках децелюляризованого матриксу.....	81
3.1.2.2. Використання методу фарбування DAPI для виявлення залишків ядерного матеріалу у зразках децелюляризованого матриксу .....	85
3.1.2.3. Визначення концентрації нуклеїнових кислот у зразках децелюляризованого матриксу методом спектрофлуометрії .....	89
<b>РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ БЕЗПЕЧНОСТІ БІОІМПЛАНТУ.....</b>	<b>94</b>
4.1. Вивчення цитотоксичних та інтегративних властивостей децелюляризованого матриксу <i>in vitro</i> .....	94
4.2. Дослідження біосумісності децелюляризованого матриксу в умовах <i>in vivo</i> .....	106
<b>РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ (ОБГОВОРЕННЯ)</b>	
<b>РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....</b>	<b>117</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>131</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>135</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>156</b>

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ВРХ - велика рогата худоба

ВВС - вроджені вади серця

ДПМ - децелюляризований позаклітинний матрикс

ЕТС - ембріональна теляча сироватка

SDS – додецилсульфат натрію

NHS/EDC-1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмід/гідроксисукцинімід 2

MES - етансульфонова кислота

## ВСТУП

**Актуальність теми дослідження.** На сьогодні серцево-судинні захворювання є основними причинами смертності у світі. Згідно даних Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), хвороби серця забирають понад 17 мільйонів життів щороку, що складає 31% усіх випадків смертності [165]. В Україні дана група захворювань є причиною 67% усіх летальних випадків серед дорослого населення та 30 % загальної смертності серед новонароджених. Щорічно майже 25 тис. українців потребують проведення процедур ургентного коронарного стентування у випадках гострого інфаркту міокарда [МОЗ України, 2020]. Вроджені вади серця (ВВС) зустрічаються з частотою близько 9% [82]. На сьогоднішній день кардіохірургічні операції виконуються майже при всіх ВВС, де в більшості випадків проводиться повна анатомічна корекція із використанням штучних імплантів. Загальна післяопераційна летальність при даних оперативних втручаннях в провідних клініках світу становить менше 3%. В той час як в ДУ «Науково-практичному медичному центрі дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України» за даними 2017 року цей показник складав 1,4% від всіх корекції ВВС у пацієнтів різного віку. Однак використання штучних протезів має низку недоліків, що значно погіршують якість життя пацієнтів у післяопераційний період. Близько третини прооперованих потребують повторних хірургічних втручань у різні терміни у віддаленому періоді. Це пов'язано з тим, що дитячий організм має унікальну здатність рости, а матеріали, які використовуються на сьогоднішній день в кардіохірургії, на жаль, не ростуть разом з пацієнтом. Так, при імплантації кондуїту в легеневу позицію на перших місяцях життя до досягнення дорослого віку пацієнту буде проведено 2-3 операції по заміні протезу в легеневій позиції на більший за розміром. Зазвичай пацієнтам необхідно проводити пожиттєву антикоагуляційну терапію. Перспективним напрямком в подоланні вищезазначених проблем може бути використання біологічних імплантів.

Проте і їх використання обумовлює низку невирішених проблем, таких як повна або часткова біодеградація та кальцифікація після імплантації [141].

В світовій медичній практиці дедалі частіше використовують біоімпланти виготовленні із ксенотканин, наприклад із перикарду свиней, коней, великої рогатої худоби (ВРХ). За еластичністю такий матеріал близький до тканин людини [166]. Для отримання такого імпланту нативний матеріал піддається біотехнологічній трансформації – децелюляризації, при якій проходить повна елімінація клітин донора і очистка від антигенних молекул зі збереженням структури позаклітинного матриксу. Отже, тканинна інженерія виконує своє завдання по створенню *in vitro* таких тканинних компонентів, імплантація яких в організмі реципієнта призводить до регенерації пошкоджених або нефункціональних тканин та органів за рахунок контролю стимуляції клітин-мішеней. Передбачається, що організм сам себе виліковує за рахунок доставки в необхідну ділянку молекулярних сигналів, клітин і/або підтримуючих конструкцій. Засобами доставки цих клітин являються скафолди, очищенні позаклітинні структури біоімпланту, що виконують роль матриці на якій відбувається трансформація клітин в необхідну тканину з формуванням визначеної конструкції [162].

На сьогодні біотехнологічні схеми із використанням різних видів ксенотканин успішно застосовують для створення органних і тканинних імплантів, зокрема клапанів серця, міокарда, перикарда, судин, легень, підшлункової залози, нирок, печінки, молочних залоз [98]. Біотехнологічно трансформовані ксеногенні скафолди (безклітинні колагеново-еластинові каркаси), успішно використовуються в медичній практиці для тканинної інженерії та регенеративної медицини [167]. Децелюляризований позаклітинний матрикс (ДПМ), виготовлений із ксеноперикарда (ВРХ) є перспективним біоматеріалом для відновлення серцево-судинної тканини, оскільки структура колаген – еластинового компоненту каркасу задовільно зберігається, а антигенні молекули належним чином елімінуються і тим



самим знижується антигенність такого матеріалу [98, 120]. Широке застосування даний матеріал знайшов в серцево-судинній хірургії, його використовують для корекції набутих і вроджених вад серця (закриття дефектів міжпередсердної і міжшлуночкової перегородок); створення штучних трикуспідального, мітрального і аортального клапанів серця; протезування та пластики судин, стулок клапанів серця; профілактики спайкових процесів у середостінні; біопротезування і пластики магістральних судин (пластика висхідної аорти); пластики кореня аорти [3, 11, 34, 44, 124]. Оскільки децелюляризований перикард має безліч властивостей, необхідних для використання в техніці заміни клапанної тканини, включаючи адекватні механічні властивості, мінімальну цитотоксичність, чудовий потенціал репопуляції клітин та схильність до ремоделювання матриксу [34, 44].

На жаль, на сьогодні як в Україні, так і в Світі, немає ідеального біоматеріалу, який би відповідав усім вимогам кардіохірургії і володів атромбогенністю, еластичністю, довговічністю, мінімальною антигенністю, відсутністю імуногенності і цитотоксичності, та міцністю, тобто був за своїми властивостями близьким до характеристик природних тканин. Тому продовжується пошук, розробка та вдосконалення методів біотехнологічної трансформації ксенотканини, які б могли забезпечити отримання високоякісного матеріалу.

Розробка нових біологічних матеріалів і біоімплантів є відносно новим науково-практичним напрямком, який інтенсивно розвивається на межі багатьох наук: біотехнології, медицини, хімії, біохімії, біофізики, гістології, генетики, імунології. Біотехнологічна розробка біосумісних матеріалів для кардіохірургії дозволить значно покращити якість життя дітей з ВВС, зменшити кількість повторних кардіохірургічних операцій, знизити вартість лікування.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**  
Дисертацію виконано в рамках науково-дослідних робіт: «Розробка та

дослідження нових біосумісних матеріалів для кардіохірургії» (ДР № 0119U001437) у лабораторії науково-діагностичного відділу координації наукових досліджень, впровадженнь та захисту прав інтелектуальної власності, підготовки та підвищення кваліфікації кадрів і відділі кардіорадіології ДУ «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України» та «Розробка інноваційних біомедичних технологій та продуктів для діагностики та лікування патологій людини» (ДР № 0119U103789) на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського.

**Мета і задачі дослідження.** *Мета роботи* – обґрунтувати біотехнологію отримання тканинних імплантів на основі перикарда ВРХ.

Для досягнення поставленої мети необхідно було розв'язати такі задачі:

1. Провести експериментальну оцінку відтворюваності та ефективності існуючих технологій отримання тканинних імплантів, визначити їх критичні недоліки та теоретично обґрунтувати оригінальні модифікації технологій, що мають забезпечувати кращі показники якості, безпечності та біосумісності імплантів.

2. Провести порівняльні дослідження різних методів децелюляризації перикарда ВРХ і визначити характер морфологічних змін біоматеріалу після впливу іонних і неіонних детергентів у процесі децелюляризації (в умовах *in vitro*).

3. Дослідити ефективність очистки децелюляризованого позаклітинного матриксу від донорських клітин.

4. Вивчити характер зміни пружно-міцнісних властивостей перикарда в процесі біотехнологічної трансформації.

5. Визначити цитотоксичний вплив децелюляризованого позаклітинного матриксу на культуру клітин людини (в умовах *in vitro*).

6. Дослідити динаміку тканинної реакції на ксенотрансплантацію імпланту, отриманого різними технологіями (в умовах *in vivo*).

**Об’єкт дослідження** – біотехнологія тканинних імплантів на основі перикарда ВРХ та їх біосумісність.

**Предмет дослідження** – методи децелюляризації перикарда ВРХ, морфологічні, імунобіологічні, біомеханічні, цитотоксичні характеристики трансформованого біоматеріалу та його біосумісність.

**Методи дослідження:** біохімічні, мікроскопічні, гістологічні, молекулярно-генетичні, фізико-механічні, культуральні, статистичні, цитотоксичний тест, ксеноімплантація лабораторним тваринам (біологічні).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше в Україні розроблено оригінальну добре відтворювану безглютаральдегідну біотехнологічну схему отримання ксенотрансплантату для використання в кардіохірургії на основі децелюляризованого матриксу перикарда ВРХ. Експериментально доведено високу ефективність розробленої технології, безпечність отримуваного біоматеріалу *in vitro* та його біосумісність *in vivo*.

Розроблено схему оцінки якості та безпечності ксеногенних біоматеріалів, призначених для трансплантації у кардіохірургічній практиці, яка передбачає визначення ступеню очистки від антигенних молекул, вивчення біомеханічних властивостей, дослідження на цитотоксичність та біосумісності.

Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи створення біосумісних ксеногенних матеріалів (трансплантатів) для використання у кардіохірургії.

**Практичне значення отриманих результатів.** У результаті проведених експериментальних досліджень було відпрацьовано відтворювані методики оцінки якості біоімплантів для кардіохірургії, а також методи їх біологічного

оцінювання згідно з вимогами стандартів серії ISO 10993 «Medical devices. Biological evaluation of medical devices».

Отриманий за розробленою технологією біоімплант характеризувався задовільними біомеханічними властивостями, антигенністю та відсутністю цитотоксичного впливу *in vitro*. Висока біосумісність отриманого імпланту, продемонстрована на експериментальних моделях *in vivo* (відсутність імуногенних реакцій, заміщення скафолду розростаючою незрілою сполучною тканиною, посилена васкуляризація), є підставою для проведення клінічних досліджень і подальшої сертифікації біоімпланту (Акт впровадження науково-методичної розробки від 18.12.2020 р., ДУ «Науково практичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України»).

Інформаційний лист № 226-2020 «Біотехнологічна схема отримання біоімпланту із перикарду великої рогатої худоби для потреб кардіохірургії» використовується органом з оцінки відповідності ТОВ «Імпрув Медикел» при оцінці відповідності медичних виробів, що регламентується постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 753 «Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів» (Акт впровадження інформаційного листа від 18.12.2020 р.).

Результати роботи впроваджено у викладання курсів «Біоматеріали і біотехнології» та «Клітинна, тканинна та біофармацевтична інженерія» для студентів спеціальності 163 Біомедична інженерія на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського (довідка про використання результатів дисертаційної роботи від 14.12.2020 р.).

**Особистий внесок здобувача.** Результати роботи, що викладено в дисертації, одержані автором самостійно або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилося спільно з науковим керівником. Забір біологічного матеріалу та підготовку гістологічних препаратів проводили спільно з Н.В. Щоткіною та Д.А. Грековим. Визначення концентрації ДНК у децелюляризованих тканинах перикарда

ВРХ проводилося дисертантом особисто. Дослідження на розтяг і розрив децелюляризованого перикарда з визначенням біомеханічних властивостей проводилося дисертантом особисто. Підготовка кріозрізів і препаратів для флуоресцентної мікроскопії проводилася спільно з Н.В. Щоткіною. Культивування фібробластів людини на скафолдах із подальшим визначенням цитотоксичності проводили спільно з Д.А. Грековим. Імплантацію тканин в організм лабораторних тварин проводили разом із Г.І. Ємцем, серцевосудинним хірургом ДУ «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України». Представлені до захисту наукові результати отримано, статистично оброблено і проаналізовано дисертантом особисто. Спільно з науковим керівником підготували наукові публікації та розробили основні положення і висновки дисертації. Аналіз літературних даних за деякими темами проводили спільно із д.мед.н. І.М. Ємцем, д.мед.н. Н.М. Руденко, д.мед.н. О.М. Романюком, к.мед.н. А.А. Довгалюком.

Автор висловлює щиру вдячність доктору медичних наук, професору І.М. Ємцю за підтримку та цінні поради під час планування й виконання роботи.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи доповідались і були обговорені на науково-практичних конференціях: IX International Conference «Medical physics – current state, issues, development directions. New technologies» (Київ, Україна, 23–25 вересня 2020); V International Scientific Conference «Actual problems of biochemistry, cell biology and physiology» (Дніпро, Україна, 1–2 жовтня 2020); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання фармакології та медичної біохімії», присвяченій 100-річчю з дня народження проф. О.О. Столярчука (Вінниця, Україна, 15–16 жовтня 2020 р.); 15th Annual Ukrainian Forum on Congenital Heart Diseases (Київ, Україна, 22–23 жовтня 2020); III Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Механізми

розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція» (Харків, Україна, 19 листопада 2020 р.).

**Публікація матеріалів.** Основні положення роботи викладені в 10 наукових працях, у т.ч. у 5 статтях у наукових фахових виданнях (2 статті у виданнях України, що включені до міжнародної наукометричної бази Scopus, та 1 стаття у науковому виданні країни, що входить до Європейського Союзу), 5 тезах конгресів, з'їздів, наукових конференцій.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційну роботу викладено на 161 сторінках друкованого тексту (117 сторінок основного змісту). Робота складається з наступних розділів: вступ; огляд літератури; матеріали і методи дослідження; 2 розділи власних досліджень і їх обговорення; аналіз і узагальнення результатів дослідження; висновки; список використаних джерел літератури; додаток. Список літератури включає 170 джерел, у тому числі 135 зарубіжних розміщених на 20 сторінках. Роботу ілюстровано 16 таблицями і 19 рисунками, з яких 12 мікрофотографій.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Сучасні потреби кардіохірургії у використанні імплантів для корекції вад серця

Біоінженерія є важливою складовою медичної науки, яка відіграє ключову роль у різнобічному науковому розвитку. У новій глобальній парадигмі охорони здоров'я серцево-судинні захворювання є основною причиною смертності, яка щороку забирає понад 17,9 мільйонів життів [68]. Кевін Мак Намара та ін. підкреслює, що поєднання ішемічної хвороби серця та всіх форм інсульту стали причиною смерті приблизно 13 мільйонів людей у всьому світі в 2015 році. Таким чином, показники поширеності та летальності від захворювань серцево-судинної системи зросли на чверть за останні 20 років [113]. Сьогодні відомо про умовний поділ тактики ведення пацієнта на два основні підходи: консервативний (фармакологічний) та оперативний (хірургічний). Більше 50% пацієнтів із серцевими захворюваннями не реагують на сучасні фармакологічні методи лікування, що вимагає нових рішень для їх хірургічного ведення [69]. Успіхи дитячої кардіохірургії покращили виживання дітей з вродженими вадами серця (ВВС), а також дозволили збільшити тривалість життя таких пацієнтів [13, 35, 43, 58]. Так в розвинених країнах світу, до 16-18 років доживають від 85 до 95% прооперованих пацієнтів [13, 24, 118]. Всі дорослі з вродженими вадами серця складаються з числа вже прооперованих дітей, що дожили до підліткового періоду, і пацієнтів з ВВС, виявленими і/або прооперованими в більш старшому віці (старше 16 років) [35, 24]. Незважаючи на існуючий попит на вдосконалення оперативних втручань, ряд обмежень, пов'язаних із розробкою сучасних методів лікування, залишається не вирішеним [14].

Потенційне використання імплантів в сучасній кардіохірургії необхідне при операції легеневого аутографта, при якій на даний момент проводять трансплантацію власного клапана легеневої артерії в аортальну

позицію [10, 15, 59, 139]. Перша операція легеневого аутографта в Україні та в країнах пострадянського простору була виконана в 1996 році в Національному інституті серцево-судинної хірургії імені М. М. Амосова. На теперішній час найбільший досвід її виконання має Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії МОЗ України [22]. Особливості вродженої клапанної вади та кореня аорти у підлітків та молодих дорослих зумовлює необхідність постійного пошуку оптимальних варіантів її хірургічної корекції та оптимізації вже існуючих підходів до стратегії лікування вроджених вад аортального клапана [59, 62, 91, 111]. Операція легеневого аутографта пропонується як єдина можлива опція у таких хворих при неможливості пластики або протезування клапана, що призводить до зростання в останні роки кількості пацієнтів віком понад 18 років, яким виконують або раніше виконували операцію Росса [10, 62, 91].

Спільний артеріальний стовбур (САТ – common arterial trunk) ще одна рідкісна вада серця з дуже не сприятливим перебігом без хірургічного втручання. Протягом першого року життя помирає 90% неоперованих пацієнтів. В той же час пацієнти з перенесеним хірургічним втручанням в подальшому стають неоперабельними за рахунок розвитку незворотної легеневої гіпертензії [24]. Одним із етапів радикальної корекції вади є реконструкція вихідного тракту правого шлуночка, при чому традиційним підходом є імплантація гомографтів. Крім того, застосовуються й інші методи, такі як імплантація свіжовиготовлених аутоперикардіальних та синтетичних кондуїтів, ксенографтів та аутологічні методи та безклапанні методики [22, 23]. Незважаючи на велику кількість запропонованих методик, оптимального методу реконструкції спільного артеріального стовбура все ще не знайдено, оскільки кожен з них має свої переваги та недоліки [9].

Цікавим є той факт, що щорічно в усьому світі проводиться понад 300 000 оперативних втручань з приводу заміни/пластики клапанного апарату серця і понад 570 000 аорто-коронарних шунтувань. Саме тому, для покриття



повної потреби у хірургічних матеріалах та засобах, застосовуються численні підходи у галузі біомедичних наук. Головною метою колаборації між приватними та державними науковими установами є створення універсального матеріалу для структурної та функціональної репарації серцево-судинної системи [109]. Серцево-судинні біоматеріали є однією з найважливіших категорій, яка стимулює інвестиції у дану сферу [50].

Саравана Кумар Джаганатан та ін. звернули увагу на актуальний аналіз ринку біоматеріалів, де найбільш представленою категорією у 2014 році були серцево-судинні матеріали. Сукупна вартість даного сегменту становить близько 20,7 мільярда доларів [87]. Одночасно значні об'єми літератури вказують на сучасне бачення та практичне використання біоматеріалів [50, 113, 162]. В ході аналітичного огляду виявлено декілька ключових та найбільш фреквентних тлумачень визначення «біоматеріал» у сучасній літературі. Тому було запропоновано використання визначення, затвердженого на засіданні Комітету з питань біоматеріалів Національного інституту охорони здоров'я (NIH): «будь-яка речовина (крім наркотичного засобу) або комбінація речовин синтетичного або природного походження, які можуть бути використані протягом будь-якого періоду часу, як цілісна система або її частина, яка обробляє, збільшує або замінює тканини, орган, або функцію організму» [162]. Слід визнати, що штучно сконструйовані зразки серцевої тканини є потенційною альтернативою синтетичним матеріалам в кардіохірургії.

Дослідження, виконані впродовж останніх десятиліть, дають підґрунтя для використання аутобіологічних матеріалів для відновлення або заміни пошкоджених тканин, наприклад, трансплантація тканин. Проте, об'єм джерел донорських тканин є надзвичайно обмеженим. Зважаючи на ряд досліджень біоінженерних матеріалів, було розглянути альтернативні інструменти для розширення можливостей лікування кардіологічних хворих, які потребують оперативного втручання. На сьогодні, біологічна та

гематологічна сумісність є одними з основних критеріїв, які, на жаль, обмежують використання та виготовлення біоматеріалів для серцево-судинних операцій. Однак використання ксенотканин (свиней, коней, великої рогатої худоби, тощо) як біоматеріалу для кардіохірургії стає все більш перспективним напрямом наукових досліджень.

## **1.2. Класифікація імплантів, що використовуються у кардіохірургії**

Кардіологічна імплантація - хірургічне втручання, застосовується лише в тих випадках, коли хвороба серця настільки велика, що уражені ділянки органу потребують заміни. На сьогодні в кардіохірургії використовують імпланти як штучного так і біологічного походження. Успішно проводиться імплантація штучного регулятора ритму (кардіостимулятора), клапанів серця, шлуночків та самого серця. Незважаючи на їх широке застосування, імпланти мають ряд недоліків серед яких відторгнення організмом донора, не здатність до росту, що змушує до повторних операцій кожні 3-4 роки, особливо в дитячому віці. Для пацієнтів, що отримали допомогу штучного протезування необхідна позитивна антикоагуляційна терапія.

Серед імплантів біологічного походження слід виділити такі, які утворені з власних клітин організму (автографти) та з клітин тканин інших біологічних видів (ксенографтів). З урахуванням сталих досягнень у використанні серцевих ксенотрансплантатів, декілька років тому розпочалася дискусія щодо можливого клінічного їх застосування. Ключовим питанням, на сьогодні, є імунологічно сумісні тканини, вироблені з клітин-попередників. Крокуючи історією, перша успішна заміна аортального клапана ксенотрансплантатом у людини була проведена у вересні 1965 р. хірургом Карпентьє та його командою в Парижі [46]. Дана подія дала початок новій ері в кардіохірургії, незважаючи на погані первинні результати: лише 60% клапанів функціонували добре через 6 місяців і лише 45% через 1 рік. Минули роки спостережень за можливими патогенетичними

механізмами та розробкою реальних підходів для зменшення антигенності клапанів. Важливим завданням було те, щоб ідеальний замітник серцевого клапана поєднував оптимальну гемодинаміку та довговічність протягом усього життя та не потребував антикоагуляційної терапії.

Нарешті, клапан було поміщено в забуферений глутаральдегідний розчин, що дало змогу очистити матрикс від антигенних компонентів та підвищити міцність за рахунок формування додаткових амінних зв'язків між поліпептидами. Маріо Лопес-Моя та ін. зауважують, що основним суперечливим аспектом даного методу є відсутність біоактивних властивостей серцевого клапану та поява прогресуючого процесу кальцифікації, що призводить до погіршення структури клапана та втрати його функції [104].

В даний час імплантація ксенотрансплантата є стандартною методикою особливо у людей похилого віку, коли пластика вже не дає добрих довгострокових результатів або технічне її виконання є неможливим. Сьогодні вже широко використовуються клапанні кондуїти, що знаходять своє застосування для реконструкції RVOT при хірургічній корекції багатьох вроджених вад серця, таких як різні види атрезії легеневої артерії, загальний артеріальний стовбур, та при операції Росса. Однак, в виборі методів реконструкції легеневої артерії одностайної думки немає [47, 96]. Загальноприйнятим методом в світовій кардіохірургічній практиці вважається використання гомографтів та ксенографтів – кондуїтів тваринного походження [86]. Але високий відсоток повторних операцій через швидку кальцифікацію цих клапанних протезів, неможливість росту обмежують їх широке застосування, особливо у пацієнтів молодого віку [86]. Важливими недоліками використання ксенографтів також є їх висока вартість, а відсутність системи отримання та збереження гомографтів в нашій країні взагалі унеможлиблюють їх застосування [23].

Впровадження у клінічну практику біологічних матеріалів із ксенотканин є ключовим напрямком у сучасному біотехнологічному прогресі. Серед таких тканин виділяють ксеноперикард і стулки клапанів серця. Біотехнологічно оброблені тканини знаходять широке застосування в реконструктивній хірургії. Так більше п'яти десятиліть ксенотканни широко застосовуються як в дитячій, так і дорослій хірургії серця і судин для корекції набутих і вроджених вад серця (закриття дефектів міжпередсердної і міжшлуночкової перегородок); створення штучних трикуспідального, мітрального і аортального клапанів серця; протезування та пластики судин, ступок клапанів серця, біясерцевої тканини; профілактики спайкових процесів у середостінні; біопротезування і пластики магістральних судин (пластика висхідної аорти); пластики кореня аорти [2, 4, 8, 11, 28, 30, 33, 34, 117].

Одним з найпоширеніших типів біоімплантів, що розроблений на основі ксенотканини, є перикардіальний пластр (патч) – це тканина з конячого або телячого перикарда, яка або децелюляризована (очищена від клітин), або виготовляється із використанням глутаральдегіду (табл. 1.1). Патчі виготовленні на основі перикарду з різних типів ксенотканин використовуються для багатьох цілей в кардіохірургії. По-перше, такий пластр призначений для покращення еластичності та усунення дефектів при операціях на серці та на артеріальних судинах в дитячій хірургії. Наприклад, пластичне розширення легеневої артерії, трансаннулярна пластика, реконструкція клапанів серця, пластичне розширення вен навколо серця і пластика коронарних артерій. Також, для реконструкції периферичних судин (наприклад, стегнової артерії) і для оклюзії дефектів внутрішньосерцевої перегородки, а також в операції Norwood I для розширення дуги аорти.

Подруге, патчі, які виготовлені із перикарду великої рогатої худоби (ВРХ) зазвичай використовуються як заплати після артеріотомії в серцево-судинній хірургії. Перикардіальні патчі з бичачого перикарду мають ряд

переваг у порівнянні з протезними латками, включаючи покращену біосумісність, легку обробку, менше кровотечі в лінії швів і, можливо, знижені темпи інфікування. Ці переваги бичачого перикарда призвели до його загального застосування під час каротидної ендартеректомії.

*Таблиця 1.1.*

**Перикардіальні пластири (патчі, заплати), які є на європейському та американському ринках**

<b>Назва продукту</b>	<b>Виробник</b>	<b>Вид біологічної тканини</b>	<b>Попередня обробка</b>
Bovine Pericardium Patch	Braile Biomedica, São José do Rio Preto, Бразилія	Перикард ВРХ	Глютаральдегід
Edwards Bovine Pericardial	Edwards Lifesciences, Irvine, CA, США	Перикард ВРХ	GA-кросс-лінкінг, запатентована антикальцифікаційна обробка
PhotoFix	CryoLife, Kennesaw, GA, США	Перикард ВРХ	Децеллюляризований та фотоокислений
SURGIFOC	FOC Medical, Buenos Aires, Аргентина	Перикард свиней, перикард ВРХ	GA-кросс-лінкінг
CardioCel	Admedus, Malaga, Західна Австралія	Перикард ВРХ	GA-кросс-лінкінг, децеллюляризований та оброблений за власною антикальцифікаційною методикою

Продовження таблиці 1.1.

Назва продукту	Виробник	Вид біологічної тканини	Попередня обробка
Matrix Patch	Auto Tissue Berlin, Німеччина	Конячий перикард	Децеллюляризований
No-React	BioIntegral Surgical Mississauga, Ontario, Канада	Перикард свиней	Власний метод, що заснований на гепарині, запобігає зниженню вивільнення альдегіду GA-кросс-лінкінгу.
Peri-Guard	Baxter International Inc. Deerfield, Illinois, США	Перикард ВРХ	GA-кросс-лінкінг

### Сфери використання та застосування перикардіальних заплат:

#### *Серцево-судинна хірургія:*

1. Закриття міжпорожнинних внутрішньосерцевих дефектів;
2. Відновлення дефектів перегородки;
3. Аннулопластика;
4. Відновлення стулок;
5. Подовження висхідної аорти (LVOT);
6. Дефекти вентрикулярної перегородки (VSD);
7. Дефекти передсердної перегородки (ASD);
8. Операція Сеннинга;
9. Операція Фонтена;
10. Операція Мастарда;

11. Реконструкція тракту відтоку легеневої артерії (RVOT);
12. Розширення тракту відтоку правого шлуночка;
13. Лікування аневризми аорти і лівого шлуночка;
14. Реконструкція передсердь і шлуночків;
15. Реконструкція та відновлення периферичних судин;
16. Стентування клубової артерії;
17. Стегнові, клубові, ниркові та великогомілкові заплати;
18. Профундопластика.

*Торакальна хірургія:*

1. Закриття бронхіальної кукси;
2. Закриття діафрагмальних гриж;
3. Лікування дефектів грудної стінки (вроджених і травматичних).

*Загальна хірургія:*

1. Хірургічне лікування гриж і вилягання;
2. Стоматологічна хірургія;
3. Протезування зовнішньої частини суглоба.

*Урологічна хірургія:*

1. Цистопластика;
2. Уретропластика.

*Нейрохірургія:*

1. Заміна твердої мозкової оболонки;
2. Каротидна ендартеректомія.

### **1.3. Способи виготовлення біоімплантів для кардіохірургії**

Одним із основних способів отримання біоімплату є застосування процесу децелюляризації, очищення матриксу від клітин та їх компонентів. Децелюляризація тканин (особливо перикарда) була запропонована як перспективний метод зменшення антигенності, таким чином, підвищення сумісності тканин, ремоделювання та довговічності [51]. Хоча на сьогодні

запропоновано різноманітні визначення терміну «децелюляризація» тканин та органів, у представленій роботі ми використаємо визначення, вперше опубліковане Естелою де Олівейра Ліма та ін. (2019): «процес забезпечення імунологічної безпеки та збереження основних структурних та функціональних компонентів позаклітинного матриксу, таких як білки, колаген та глікозаміноглікани (GAG)». Децелюляризація - це спосіб/процес отримання біологічних каркасів, який спрямований на видалення клітин з тканини зі збереженням позаклітинного матриксу. Повна децелюляризація із збереженням архітектури тканин досягається за допомогою фізичних, хімічних та ферментативних агентів [72].

*Фізичний спосіб децелюляризації включає такі процеси:*

- заморожування (внутрішньоклітинні кристали льоду руйнують клітинну мембрану);
- механічне розчавлювання клітин;
- механічне перемішування («відлущування») клітин;
- сонікація – руйнування клітин ультразвуковими хвилями;
- ліофілізацію;
- $\gamma$ - та  $\beta$ -випромінювання.

*Хімічний спосіб децелюляризації здійснюється з використанням наступних сполук:*

- неіонні детергентами (Тритон X-100);
- іонні детергентами (додецилсульфат натрію, Тритон X-200);
- цвітеріонні детергентами (CHAPS, SB-10, SB-16);
- гіпо- та гіпертонічні розчини;
- хелатуючі агенти ЕДТА і ЕГТА.

*Ферментативний спосіб децелюляризації здійснюється з використанням наступних ензимів:*

- трипсин;
- ендонуклеаза;



- ДНКаза

*Крос – лінкінг (зшивання) здійснюється з використанням наступних сполук:*

- альдегіди (формальдегід, глутаровий альдегід (ГА);
- поліефіри або епоксидні сполуки;
- карбодііміди;
- ацилазиди;
- гексаметилендіїзоціанат і поліуретан.

Для процесу очистки тканини перикарду застосовують фізичні методи децелюляризації, такі як перемішування, заморожування/відтавання та застосування тиску. Для даних методів, як правило, характерно наявність етапу промивання для видалення залишків зруйнованих клітин. Уейнрайт та ін. опублікував дослідження, в якому використовувались цикли заморожування/відтавання для лізису клітинних мембран як, перший крок у децелюляризації [59]. Використання даної техніки в поєднанні з детергентами та ферментами дозволила скороти час децелюляризації свинячого серця до 10 год за рахунок руйнування клітинних мембран [157].

Іншим фізичним методом є механічне перемішування, що базується на фізичному лізисі клітинної мембрани. Тканину поміщають у хімічні та ферментні розчини з подальшим постійним перемішуванням до повного руйнування клітин. Застосування тиску в поєднанні з надкритичними рідинами, такими як CO<sub>2</sub>, може використовуватися як і для невеликих шматочків тканини, так і для децелюляризації цілих органів. Надкритичний CO<sub>2</sub> має критичну температуру 31,1 ° C і тиск 7,40 МПа, що робить його біосумісним розчином без подальшого етапу промивання [145]. Рідина і тиск розривають клітинні мембрани, після чого видаляють клітинний вміст.

Реагенти для децелюляризації на хімічній основі складаються з іонних і неіонних миючих засобів, кислот та основ, а також гіпертонічних або гіпотонічних розчинів. Ці хімічні речовини лізують клітинні мембрани та вимивають клітинні та ядерні матеріали за рахунок зміни осмотичних

градієнтів [170]. Доведено високу ефективність миючих засобів для видалення клітинного вмісту з багатьох типів тканин, але дані засоби необхідно застосовувати при низьких концентраціях, щоб зменшити порушення ультраструктури екстракорпорального матриксу та зберегти концентрації глікозаміноглікану [49, 73, 93]. Додецилсульфат натрію (Sodium dodecyl sulphate, SDS) є одним із найбільш широко використовуваних аніонних детергентів для створення кардіоімплантів, оскільки він може ефективно вимивати цитоплазматичні білки та ядерні речовини з товстого міокарда більшою мірою, ніж інші миючі засоби [127, 142]. Однак SDS погано вимивається, так як це аніонна поверхнево-активна речовина, що може залишатися зв'язаною з білками екстракорпорального матриксу. Це призводить до подальших небажаних змін в біохімії та структурі децелюляризованого матриксу. Ще одним неіоногенним детергентом є Тритон X-100, що застосовується для очистки матриксу від клітинних компонентів та вимивання залишкового вмісту SDS [72, 127]. Хоча використання Тритон X-100 призводить до утворення безклітинного серцевого клапана, проте він є менш ефективний у очищенні міокарда та стінки аорти від клітинних залишків [74].

Децелюляризація на основі ферментів дозволяє вимити клітинні компоненти з нативної тканини за рахунок розриву зв'язків між клітинами та матриксом та всередині нуклеїнових кислот. Нуклеази, такі як РНКаза та ДНКаза використовуються для розщеплення РНК та ДНК на більш короткі ланцюги [107]. Оскільки дані нуклеази націлені на внутрішньоклітинний вміст, то для більшої ефективності вони часто використовуються поряд з іншою технікою децелюляризації, такою як високий тиск [55]. Ще одним з найпоширеніших ферментів є трипсин, серинова протеаза, яка гідролізує білки на С-кінці лізину або аргініну, за винятком амінокислоти проліну. Трипсин часто використовується для видалення клітин з культуральних планшетів [66]. Зазвичай трипсин застосовують після обробки тканини

Тритон X-100 або ж додецилсульфатом натрію, таким чином забезпечується повне видалення залишкового клітинного матеріалу зі скафолду (позаклітинного матриксу) [114, 137]. До менш поширених ферментів, що використовуються при децелюляризації, належать колагеназа, диспаза та альфа-галактозидаза [55]. Однак високі концентрації ензимів можуть порушити ультраструктуру екстракорпорального матриксу [72].

Наступним етапом після процесу очистки матриксу є стабілізація та фіксація частково порушених еластин-колагенових волокон. Одним з таких методів є крос-лінкінг, що успішно використовують в медицині при лікуванню катаракти і очних хвороб [163]. Так як причиною катаракти являється послаблення колагену, тому була вирішена задача покращити біомеханічні властивості колагену і це успішно застосовується *in vivo*. Дана методика знайшла застосування у тканинній інженерії. Метод базується на «зшиванні» тканини, тобто формуванню нових ковалентних зв'язків для з'єднання двох полімерних ланцюгів, що робить структуру матриксу міцнішою. Для прикладу, розчинний карбодіїмід EDC (1-Етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмід) активує карбоксильну групу в амінокислоті перетворюючи її на проміжну речовину ізосечовину, що в свою чергу зв'язується з залишками лізину або іншими доступними первинними амінами. Таким чином, між двома білковими ланцюгами формується додатковий зв'язок. Для посилення ефективності даного карбодіїмиду його використовують в комплексі із NHS (N-гідроксисукцинімідом – органічна речовина, похідна піролідину). NHS також активує карбоксильну групу, змінюючи її до активованого ефіру карбонової кислоти, що реагує з аміногрупами з утворенням амідів, формується новий зв'язок між ланцюгами. Для стабілізації процесу «зшивання» реакцію проводять в буфері MES (2-(N-морфоліно)етансульфонова кислота).

Для успішної децелюляризації необхідно враховувати ряд чинників, включаючи вміст клітин, щільність, вміст ліпідів та товщину зрізу. В ідеалі,

децелюляризація повинна мінімально впливати як на архітектуру позаклітинного матриксу, так і на механічні властивості тканини. Первинною кінцевою точкою в більшості методів децелюляризації є оцінка ступеню очистки тканин та її механічні властивості. У таблиці 1.2 узагальнено найпоширеніші методи, що застосовуються для децелюляризації перикарда. Дослідження, представлене Вольманн та співавт. сприяє розвитку розуміння децелюляризації перикарда людини із застосуванням зменшеної кількості розчинника для застосування у якості серцево-судинного патча [164].

Таблиця 1.2

### Протоколи децелюляризації тканин

Детергент	Механізм	Ефект	Приклад методу
Додецил сульфат натрію (SDS)	Іоногенний	Цитотоксичність при деяких концентраціях Зміна мікроструктури	10 Tris-HCl та інгібітор протеази + 0,1% SDS + 50 ОД/мл ДНКаз та 1 ОД/мл РНКаз Гіпотонічні/гіпертонічні розчини + 1% SDS
Тритон Х-100	Неіоногенний (зазвичай використовуються з гідроксидом амонію)	Менше пошкоджує структуру тканини, ніж іонні поверхнево-активні речовини	0,1% SDS + Тритон Х-100 + 0.1 мг/мл ДНКаз
Гідроксид Амонію	Руйнує спайки клітинного матриксу	-	Ацетон + Етанол + 1 N NaOH + 7% NaCl + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Застосування децелюляризованих тканин у кардіохірургії вже є усталеною практикою, однак перспектива використання децелюляризованого перикардіального патча, структурні компоненти якого збережені, а антигенні молекули належним чином еліміновані, викликає значний інтерес у колі клініцистів [102]. Адгезія клітинного апарату та підтримка ідеальних механічних характеристик є оптимальними показниками, поруч із зниженням імуногенності трансплантата. Описані особливості сприяють регенерації тканин та поліпшення якості життя пацієнта. Цікаво, що численні ефекти щодо безпеки та ефективності були досягнуті в експериментах *in vivo* з підшкірною імплантацією децелюляризованого перикарда на тваринних моделях. Зниження імуногенності, зменшення цитотоксичності та поліпшення інтеграції трансплантата спостерігали порівняно зі свіжою/замороженою або закріпленою глутаральдегідом імплантованою тканиною [112]. Аналізи *ex vivo* виявили низьку імунологічну відповідь, посилений ангіогенез та диференціацію кардіоміоцитів [133]. Нарешті, використання децелюляризованих патчів, протестованих на тваринних моделях, показало посилену інтеграцію трансплантата, низьку імуногенність та рецелюляризацію скафолдів [155].

На сьогоднішній день головним питанням є досягнення ефективного видалення клітин, підтримання властивостей позаклітинного матриксу та збереження механічної цілісності децелюляризованого перикарда ВРХ.

Усі вищезазначені дослідження вказують, що біоматеріали та протоколи їх виготовлення є важливими, особливо враховуючи той факт, що серцево-судинні захворювання є провідною причиною смерті у всьому світі. Децелюляризовані перикардіальні патчі у тварин широко використовуються в кардіохірургії дорослих та дитячих груп, і їх адекватна підготовка може призвести до біосумісності природними тканинами.

В якості останнього коментаря можна сказати, що протоколи децелюляризації тканин повинні бути націлені на повне видалення клітин, збереження структури та граничних властивостей розтягування.

#### **1.4. Різновид біоматеріалу для виготовлення кардіохірургічних імплантів**

На основі ретроспективного аналізу, ми класифікували медичні матеріали на три основні класи, а саме на метали, полімери та біологічні матеріали. У таблиці 1.3 нижче наведено деякі типи кожного класу. Одночасно, описані біоматеріали діляться на дві великі групи: синтетичні (полімери та метали) та природні.

*Таблиця 1.3*

##### **Матеріали для кардіохірургічних імплантів**

<b>Вид матеріалу</b>	<b>Приклад</b>
<b>Біологічні матеріали</b>	Гомотрансплантати
	Біоматеріали із свині
	Біоматеріали із биків
<b>Полімери</b>	Поліаміди
	Поліолефін
	Поліефіри
	Поліуретан
<b>Метали та сплави</b>	Нержавіюча сталь
	Сплав кобальту
	Титановий сплав
	Сплав хрому

Як зазначає Метью В. Кертіс, природні біоматеріали отримують із власних тканин з аутогенних, алогенних або ксеногенних джерел (тварини: бичачі або свинячі тканини) [57]. Дані матеріали є кращими завдяки біосумісності та швидкості біодеградації, мінімізації імунної відповіді для запобігання інкапсуляції біоматеріалів.

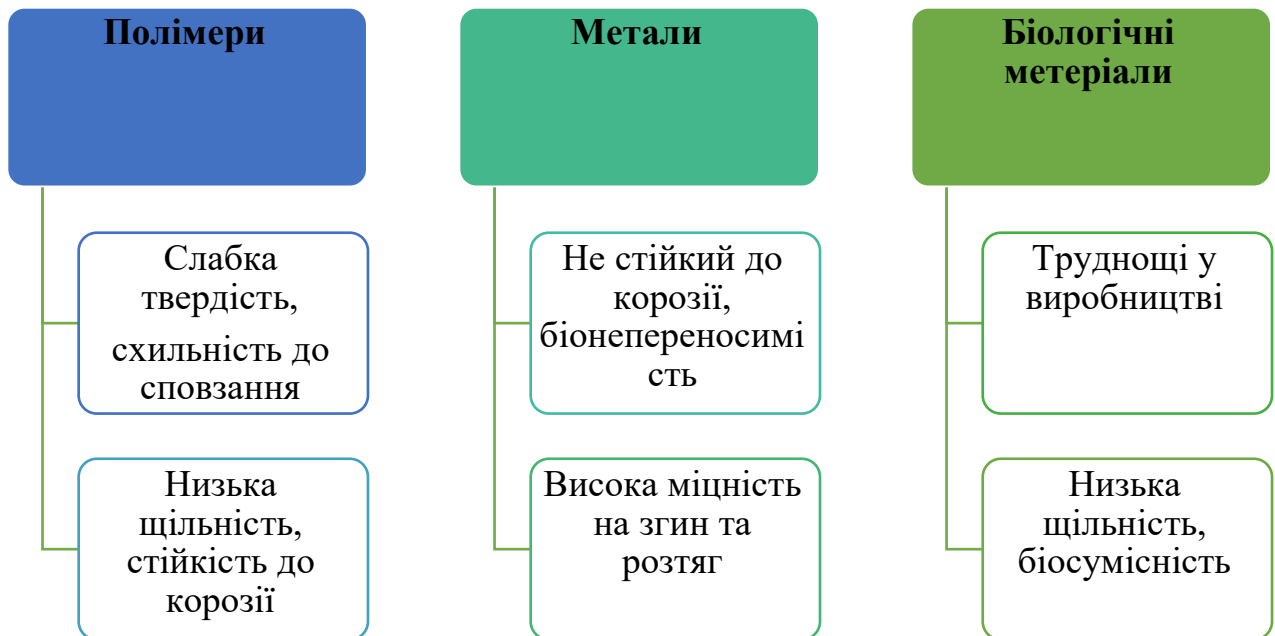
Сучасні тенденції в галузі біоінженерії переглядають ключові характеристики біоматеріалів, оцінюючи їх безпеку, ефективність та спроможність до виробництва задля використання в кардіохірургії. Існує кілька можливих показників матеріалів, які слід охопити перед впровадженням у клінічну практику: (1) вибір найбільш компетентного матеріалу для застосування, (2) вплив на навколишнє середовище, (3) біодоступність, (4) деградація тощо. В даний час встановлено ряд переваг та недоліків, які можуть вплинути на співвідношення користі та ризику (табл. 1.4).

Тим не менше, вищезазначені матеріали широко використовуються у галузі виробництва серцево-судинних матеріалів. Як приклад, для виготовлення стентів використовують переважно металеві сплави. Найбільш бажаними особливостями стентів, які можуть бути досягнені за допомогою використання металів, є (1) відсутність тромбогенезу задля запобігання оклюзії артерії; (2) стійкість до змін артеріального тиску; (3) гнучкість та (4) легкість імплантації [132]. З іншого боку, у штучних клапанах серця (механічні та біологічні клапани) всі три типи біоматеріалів можуть застосовуватися залежно від цілей та клінічних кінцевих точок.

На жаль, економічна ефективність, численні незручності, пов'язані з додатковою терапією, та ризик повторної операції після введення імплантації протезу залишаються важливими проблемами. Стратегія антимінералізації є однією з найбільших проблем у виробництві біоінженерних матеріалів для кардіохірургічного процесу.

Таблиця 1.4

**Переваги та недоліки різних типів біоматеріалів до застосування в  
кардіохірургії**



### 1.5. Особливості використання перикарду великої рогатої худоби для виготовлення кардіоімплантів

Перикард ВРХ набув загального клінічного використання протягом останніх 20 років, особливо як пластир (патч) для закриття артерій під час судинних та серцевих операцій. Пластини перикарду ВРХ мають багато технічних переваг, включаючи простоту використання, меншу кровоточивість з швів та можливість негайного проведення артеріального дуплексного дослідження на місці ангіопластики, що призвело до їх широкого поширення в кардіохірургічній практиці. Однак довгострокові дослідження даного біоматеріалу недостатньо задокументовані і потребують обережного тлумачення щодо того, чи пов'язана його довготривала ефективність із самим матеріалом або ж з операцією, в якій він використовується. Наприклад, не з'ясовано остаточно чи рестеноз після



каротидної ендартеректомії безпосередньо пов'язаний із самим пластиром, чи рестеноз є неминучим наслідком самої хірургічної процедури.

Нативна структура перикарда ВРХ має три оболонки: 1) серозну, внутрішній тонкий шар, що складається з клітин мезотелію; 2) фіброзну, більш товстий шар, утворений різноспрямованими, хвилястими пучками колагену та еластину; 3) епіперикард, зовнішній шар сполучної тканини. Комерційно доступні патчі являють собою безклітинний матрикс позбавлений антигенних молекул донора, що попереджає процеси відторгнення при трансплантації [53]. Процес децелюляризації перикарду може призводити до розриву зв'язків між молекулами колагену, що призводить до зниження пружно-міцнісних властивостей патчу. Тому після процесингу використовують хімічні агенти, що «зшивають» поліпептиди між собою. Одним з таких агентів є глютаральдегід, що каталізує утворення додаткових аміних зв'язків між  $-NH_2$  групами лізину, гідроксилізину або N-кінця амінокислот. В результаті чого утворюються ковалентні зв'язки між сусідніми білками, що стабілізуються при фізіологічній температурі та рН. Таке поперечне зшивання поліпептидних ланцюгів збільшує міцність тканини, інгібує біодеградацію, а також знижує антигенність тканини. Однак, неповне усунення залишкового глютаральдегіду до імплантації пластиру може призвести до пізньої кальцифікації пластиру *in vivo* та порушення його функціональності.

Перикард ВРХ як серцево-судинний пластр має декілька переваг у використанні. Дані переваги можна розділити на дві групи, тобто переваги, які були чітко визначені та документально підтверджені (простота у використанні, довговічність, високі біомеханічні характеристики, біосумісність, відсутність кровотечі лінії шву, негайна інсонація) та переваги, які були відмічені та можливі, але поки ще недостатньо задокументовані (антикальцифікація, знижений рестеноз, зниження інфекційності, підтримка росту клітин). Існує декілька добре відомих особливостей бичачого

перикарда. По-перше, це його надійна структура. Перикард ВРХ можна виготовляти та обробляти до стабільної номінальної товщини 0,5 мм, забезпечуючи при цьому повне утримання швів, а також ідеальні експлуатаційні характеристики [125]. Таким чином, після імплантації відмічається значно менше кровотеч із ліній хірургічних швів ніж в аналогічних протезних пластирів із іншого біологічного матеріалу. Бичачий перикард також є дуже біосумісним за рахунок високої міцності, низької антигенності та протимікробної дії. Відзначено, що підвищена міцність матеріалу корелює з довготривалим клінічним використанням. Оскільки пластири з перикарду ВРХ є фіксованою тканиною, це також забезпечує перевагу доступності готової продукції [119]. Нарешті, оскільки бичачий перикард - це тверда тканина, без повітряних проміжків, інсонація ультразвуком можлива відразу після імплантації.

Слід відзначити, що пластир із перикарду ВРХ по суті безклітинний і являє собою чистий колаген. Тим самим він може забезпечити природну міграцію мікроелементів та проліферацію клітин реципієнта, прискорюючи ендотеліалізацію та регенерацію тканин [45, 95]. Деякі виробники стверджують, що їх пластирі мають технологію антикальцифікації, яка може значно зменшити кальцифікацію та підтримати ендотелізацію [56].

В науковій літературі повідомлялося про використання даних пластирів для закриття артеріотомії при інфекційному зараженні ділянки з подальшим успішним процесом регенерації [60, 90]. Однак статистично достовірних даних щодо бактерицидної або бактеріостатичної дії пластирів із перикарду ВРХ оброблених глютаральдегідом на сьогодні не має, як і не описано жодних досліджень на лабораторних тваринах.

На сьогодні перикард ВРХ використовується при судинних хірургічних операціях як матеріал, що закриває ділянку при поздовжній артеріотомії ("пластирна ангіопластика"). Оскільки первинне закриття поздовжньої артеріотомії може призвести до раннього рестенозу, через неоінтимальну

гіперплазію, тому рекомендується закриття оперованої ділянки пластиром. Найчастіше ангіопластика за використання таких патчів застосовується після каротидної ендартеректомії, де встановлено ефективність пластиру за рахунок зменшення кількості ранніх та пізніх ускладнень [75].

Пластир із бичачого перикарду широко використовується в кардіохірургії і торакальної хірургії, в тому числі в якості біопротезних стулок клапана, для відновлення внутрішньосерцевих дефектів і дефектів діафрагми. В літературі по кардіохірургії міститься порівняння бичачого перикарду з іншими матеріалами, такими як політетрафторетилен, для закриття дефектів міжшлуночкової перегородки [154]. Автори дослідження повідомили, що, хоча після закриття дефекту міжшлуночкової перегородки між двома матеріалами не було значних відмінностей в результатах, хірурги віддали перевагу перикарду ВРХ через його еластичність і більш низький ризик післяопераційного ендокардиту.

### **1.6. Вимоги до тканин ксенотрансплантанту для його використання у кардіохірургії**

Для оцінки ксенотрансплантанту як медичного виробу, тобто такого що призначений для використання в медичній практиці, застосовують системний підхід з урахуванням переваг та недоліків біологічного матеріалу та методів дослідження. Гарантією того, що біоімплант в готовому вигляді буде функціонувати відповідно до призначення і його застосування буде безпечно для людини, є проведення оцінки його біологічної дії на основі інформації про переваги і недоліки різних матеріалів і методів досліджень.

При виборі матеріалів для виготовлення біоімпланту, в першу чергу необхідно враховувати їх відповідність до призначення по їх хімічним, токсикологічними, фізичним, електричним, морфологічним і біомеханічним властивостями. Також важливо оцінити такі параметри як вихідний матеріал; наявність спеціальних добавок, домішків або ж залишкових речовин;

продукти вимивання; продукти деградації; інші компоненти і їх взаємодію в кінцевому продукті; властивості і характеристики кінцевого продукту. Будь-які дослідження *in vitro* та *in vivo* проводять, ґрунтуючись на застосуванні кінцевого продукту і виконанні лабораторних вимог, при подальшій інтерпретації результатів досліджень компетентними фахівцями. По можливості, дослідження *in vitro* проводять до початку досліджень *in vivo*.

Оцінка фізико-механічних характеристик вихідного матеріалу необхідна для отримання більш повної інформації про структуру та властивості ксенотканини та формування подальших рекомендацій щодо використання при оперативних втручаннях. З огляду на те, що ксеноперикард має все більше застосування в кардіохірургії, збільшуються і вимоги до даного матеріалу. Наприклад, у випадках де ксеноперикард використовують як заплату для закриття певної порушеної ділянки без механічного стресу в подальшому, вимоги до фізико-механічних параметрів матеріалу будуть мінімальні. Однак використання ксеноперикаду в травматології чи ортопедії при пластиці сухожильно-зв'язувального апарату підвищує вимоги до механічних властивостей трансплантату і навіть робить їх вирішальними.

Біомеханічні властивості ксеноперикардіальної тканини на сьогодні добре вивчені, про що свідчить велика кількість наукових праць з даного питання [5]. Пружно-міцнісні властивості тканини ксеноперикарду залежать від особливостей направленості білкових волокон. Дана тканина володіє достатньо вираженими анізотропними властивостями [152, 153]. Пружно-міцнісні характеристики зразків, що вирізані вздовж напрямку волокон структурних білків, значно вищі ніж у зразків з поперечним напрямком.

Абсолютні показники пружно-міцнісних властивостей ксеноперикардіальної тканини можуть різнитися в залежності від джерела отримання. Це пов'язано як із конкретним видом і режимом обробки тканини, так і видом тварини, де вилучається тканина (свині, коні, бики).

При дослідженні фізико-механічних властивостей ксеноперикарду визначають наступні основні параметри:

- максимальна міцність тканини на розрив;
- відносне подовження;
- модуль пружності (залежність напруження – відносне подовження).

Для визначення фізико-механічних параметрів біотканини використовують різні експериментальні механічні машини для вимірювання [16]. Вибір такої машини залежить від поставлених задач. Як правило, інформації про вказані характеристики, достатньо щоб зробити висновок про те, що являє собою матеріал і наскільки адекватно він пройшов цикл біотехнологічної трансформації. Однак існують деякі сфери, що висувають більш високі вимоги до матеріалу. Наприклад, при розробці біологічних штучних клапанів серця більше значення має ступінь і рівномірність зшивки матеріалу зшиваючим агентом. При використанні глутаральдегіду може пройти нерівномірне зшивання колагену (зшивання по поверхні), що може призвести до утворення багат шаровості матеріалу і, як наслідок, обмеження механічних властивостей стулок клапана при циклічних навантаженнях. У таких випадках пружно-міцнісні властивості біотканин визначаються по «істинним діафрагмам деформування» [18] для поздовжньої і поперечної деформації при одноосьовому і однорідному розтягуванні зразків в головних напрямках анізотропії механічних властивостей.

Дослідження деформаційно-пружних характеристик методом релаксаційної спектрометрії допомагає вивчити структуру біологічної тканини і встановити зв'язок між отриманими фізико-механічними характеристиками і їх змінами в результаті біотехнологічної трансформації. За даними фізико-хімії полімерів відомо, що утворення додаткових зшивок (на стадії стабілізації ксенотканина обробляється зшиваючим агентом) в системі повинно призводити до збільшення модуля пружності. Можливо тому, в більшості робіт в якості критеріїв визначення ступеня зшивання

пропонується використання таких фізико-механічних характеристик як руйнівне напруження при розтягуванні, визначення модуля пружності, метод релаксаційної спектрометрії.

Окрім контролю біомеханічних властивостей ксеноперикарду для оцінки якості обробки біотканини використовують гістологічні та гістохімічні методи досліджень і контролю структур сполучних тканин. Для оцінки наявності клітин в модифікованій тканині перикарду використовують метод фарбування гематоксилін-еозин. При якому ядра зафарбовуються в синьо-фіолетовий колір, а цитоплазма в жовтувато-рожевий. А для більш детального вивчення структури колагенових волокон та еластинових волокон використовують такі методи як фарбування по методу Конго, Ван-Гизона, гематоксилін-пірофуксин, тощо.

На сьогодні в Україні при створенні нового медичного продукту виробник повинен дотримуватися норм законодавчої бази, а саме ДСТУ (EN ISO 10993-5:2015) Біологічне оцінювання медичних виробів. Згідно даного документу визначено процедуру дослідження медпрепарату. Пункт 5.2.2 даного документу визначає, що при дослідженні цитотоксичності необхідно обрати методи з використанням клітинних культур для визначення їх лізису, а також інших видів впливу на клітини обумовленими медичним виробом, матеріалом або ж екстрактами із них. Методи дослідження на цитотоксичність викладені в ISO 10993-5.

Пункт 5.2.9 визначає основні положення щодо імплантація протезу. Цими дослідженнями визначають місцеву патогенну дію на живу тканину (на макроскопічному і мікроскопічному рівнях) при вивченні зразка матеріалу або кінцевого продукту, що імплантований (ISO 10993-1-2011) хірургічним шляхом або розміщується в певну тканину відповідно до передбачуваного застосуванням. Обрані методи досліджень зазвичай відповідають виду і тривалості контакту. Методи дослідження місцевої дії після імплантації вибирають відповідно до ISO 10993-6.

Також при роботі зі ксенотканинами необхідно керуватися стандартом ISO 22442-1-201, що поширюється на медичні вироби, за винятком діагностичних медичних виробів *in vitro*, виготовлених з використанням матеріалів тваринного походження, що є нежиттєздатними або наведеними в нежиттєздатне стан. Призначенням даного стандарту є надання вимог і рекомендацій по контролю ризику, пов'язаного з небезпеками, характерними для медичних виробів, вироблених з використанням тваринних тканин або їх похідних, такими як:

- a) контамінація бактеріями, пліснявими або дріжджовими грибами;
- b) контамінація вірусами;
- c) контамінація агентами, що викликають інфекційні губчасті енцефалопатії;
- d) матеріал, що викликає небажані пірогенні, імунологічні або токсикологічні реакції.

### **Резюме**

В розділі висвітлено теоретичне узагальнення щодо актуальності використання імплантів у кардіохірургічній практиці та наведено їх класифікацію відповідно до способу виготовлення, різновиду матеріалу та функціональності. Аналіз даних літератури встановив високу необхідність створення безпечних протезів на основі ксеноперикарду. Висвітлено обґрунтування застосування перикарду великої рогатої худоби при виробництві біоімплантів згідно сертифікованих вимог до застосування в хірургічній практиці при порушеннях цілісності тканин серцево-судинної системи.

## **РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Робота виконана у лабораторії науково-діагностичного відділу координації наукових досліджень впровадження та захисту прав інтелектуальної власності та підвищення кваліфікації кадрів ДУ «Науково – практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії» МОЗ України.

Усі експерименти виконані у відповідності з вітчизняними і міжнародними біоетичними нормативними документами; зокрема, матеріалами IV Європейської Конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (ETS 123 (1986), ратифікованою в Україні, законодавчими документами України по проведенню експериментів на тваринах, такими як «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим національним конгресом з біоетики (20.09.2001).

### **2.1. Матеріали і методи досліджень**

#### **2.1.1. Перикард великої рогатої худоби**

Матеріалом дослідження був перикард великої рогатої худоби (ВРХ). Перикардіальну сумку вилучали у безпорідних 12 - 18 -місячних биків протягом 20 хв після забою на ТОВ «Антонівський м'ясокомбінат». Всі тварини пройшли ветеринарний огляд, та мали ветеринарний сертифікат. Максимально доступної атравматичності та врахування анатомічних особливостей тварин було дотримано у процесі вилучення органу згідно правил асептики [123].

Біоматеріал (перикард) транспортували до лабораторії протягом години в стерильному розчині Хенкса в контейнері на льоді. Потім перикардіальний мішок ретельно препарували, розділяючи серозний шар від фіброзного. З останнього видаляли жирові привіски та надлишки сполучної



тканини. Для відмивання фрагментів виділеного перикарду від залишків компонентів крові його поміщали в колби з дистильованою водою об'ємом 1000 мл та безперервно перемішували (70 об/хв) протягом 3-ох годин при  $t$  4°C. Очищені фрагменти перикарду розрізали на лоскути розміром 40 × 40 мм (рис. 2.1).

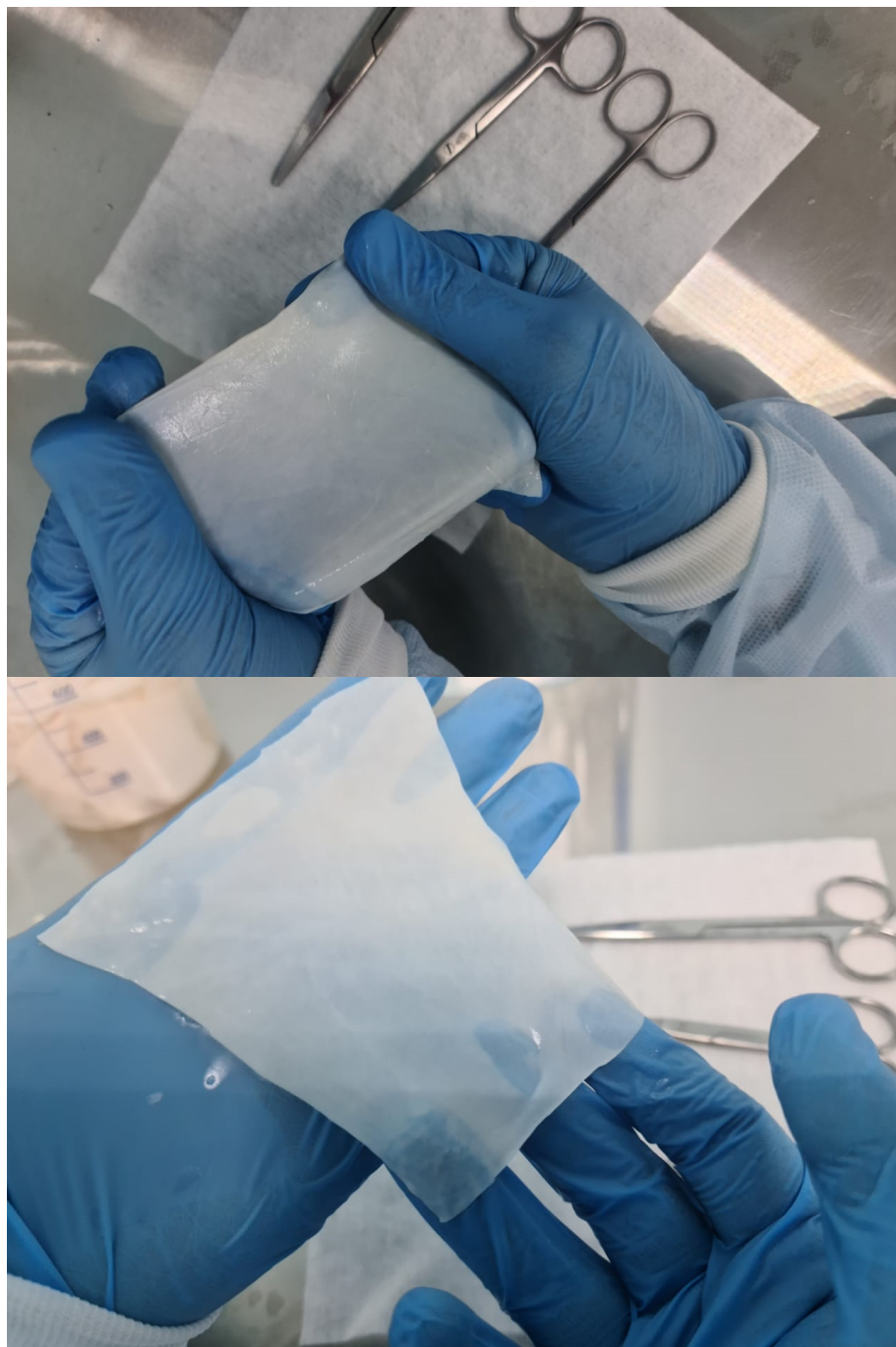


Рис.2.1 Очищені фрагменти перикарду великої рогатої худоби.

### **2.1.2. Культури клітин.**

Для проведення експериментальних досліджень було використано культуру клітин фібробластів людини трансфекованих флуоресцентним білком мітохондріальної локалізації: FBhTERTimmort+mcherry – лінія клітин фібробластів людини, яким генно-інженерним шляхом надана властивість до флуоресценції. Клітини вирощувалися в полістиролових культуральних флаконах з робочою поверхнею 25 та 75 см<sup>2</sup>. В якості середовища для культивування використовувалися середовища ДМЕМ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose, Sigma, США), модифіковане середовище Ігла за способом Дульбеко, що широко використовується для підтримки росту багатьох видів клітин, в тому числі і первинних фібробластів з додаванням 10% ЕТС та антибіотиків (150 од/мл пеніциліну і 100 од/мл стрептоміцину або гентаміцину). Культивування проводили за загальноприйнятою методикою [17, 19, 25].

### **2.1.3. Лабораторні/експериментальні тварини**

Для визначення біосумісних властивостей зразки децелюляризованого перикарду імплантували в організм щурів лінії Вістар. Лабораторні тварини для випробування зразків були придбані у віварії факультету ветеринарної медицини «Національного університету біоресурсів і природокористування України». Загальна кількість тварин становила 15 одиниць. Утримання під час експерименту, мікроклімат, температура, вологість, світловий режим, об'єм повітря, тип підстилки відповідали прийнятим в нашій державі нормативам документам, які регламентують використання тварин для експериментальних досліджень, а також вимогам Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною метою [1]. Протягом усього експерименту вони містилися в стандартних умовах віварію.

## 2.2. Технологія виготовлення децелюляризованого матриксу

Проаналізувавши дані наукової літератури, було обрано 5 найефективніших біотехнологічних схем трансформації тканин, що застосовувалися при виготовленні різних біоімплантів (для трансплантації шкіри, судин, кісток). В результаті чого ми створили і модифікували протоколи біотехнологічного процесу виготовлення очищеного позаклітинного матриксу перикарду ВРХ за допомогою децелюляризації для виготовлення біоімплантів, які можна буде безпечно використовувати у кардіохірургії. Таким чином було сформовано п'ять дослідних груп. В якості контролю використовували нативний перикард.

Для технологічної очистки тканини від антигенів та клітинних компонентів було обрано хімічний спосіб децелюляризації із використанням іонних та неіонних детергентів, ферментів.

Технологічний процес децелюляризації складався з декількох етапів. Перший етап процесингу був спільний для всіх груп: зразки (по 5 зразків з кожної групи на 500 мл розчину) піддавалися впливу осмотичного шоку, їх поміщали в стерильну дистильовану воду  $t\ 4^{\circ}\text{C}$  на 72 години при постійному перемішуванні 200 об/хв. Заміну води проводили кожні 6 – 8 годин.

Біотехнологічний процес децелюляризації зразків перикарда ВРХ Технології 1 (Гідроксид амонію + Тритон X-100) складався з наступних етапів: (1) зразок перикарду розміром  $40 \times 40$  мм, поміщений у пляшку об'ємом 200 мл, що містить 100 мл 2% Тритон X-100 (Sigma-Aldrich, США) та 0,2% амонію Гідроксиду амонію (Sigma-Aldrich, США), (2) постійне струшування (200 об / хв) протягом 30 днів при  $t\ 4^{\circ}\text{C}$  [147, 161]. Розчин для лізису клітин змінювали один раз на день.

Біотехнологічний процес децелюляризації зразків перикарда ВРХ Технології 2 (Тритон X-100 + 0,2% Гідроксид амонію + 1% Додecilсульфат натрію (Sodium dodecyl sulfate, SDS): (1) зразок перикарду розміром  $40 \times 40$  мм, поміщений в 200 мл пляшку, що містить 100 мл 2% Тритон X-100

(Sigma-Aldrich, США) та 0,2% Гідроксиду амонію (Sigma-Aldrich, США) та 1% SDS (Sigma-Aldrich, США), (2) постійне струшування (200 об / хв) протягом 30 днів при  $t\ 4^{\circ}\text{C}$  [147, 161]. Розчин для лізису клітин змінювали один раз на день.

Біотехнологічний процес децелюляризації зразків перикарда ВРХ Технології 3 (1% SDS): (1) зразок перикарду розміром  $40 \times 40$  мм, поміщений в 200 мл пляшку, що містить 100 мл 1% SDS (Sigma-Aldrich, США) (2) при постійному струшуванні (200 об / хв) протягом 30 днів при  $t\ 25^{\circ}\text{C}$  [147, 159]. Розчин для лізису клітин змінювали один раз на день.

Біотехнологічний процес децелюляризації зразків перикарда ВРХ Технології 4 (Трипсин +1% SDS): (1) зразок перикарду розміром  $40 \times 40$  мм, поміщений в 200 мл пляшку, що містить 100 мл 0,25% розчину трипсину - EDTA (Sigma-Aldrich, США) та 1% SDS (Sigma-Aldrich, США) (2) при постійному струшуванні (200 об / хв) протягом 30 днів при  $t\ 4^{\circ}\text{C}$  [120, 135]. Розчин для лізису клітин змінювали один раз на день.

Біотехнологічний процес децелюляризації зразків перикарда ВРХ Технології 5 (0,1% SDS): (1) зразок перикарду розміром  $40 \times 40$  мм, поміщений у 200-мл пляшку, що містить 100 мл 0,1% SDS (Sigma-Aldrich, США) з (2) постійним струшуванням (200 об/хв) протягом 30 днів при  $t\ 4^{\circ}\text{C}$  [121, 143, 148, 159]. Розчин для лізису клітин змінювали один раз на день.

Розчин для лізису клітин змінювали один раз на день для всіх технологічних протоколів децелюляризації. Детоксикація зразків отриманого матеріалу проводилася шляхом відмивання у стерильній дистильованій  $\text{H}_2\text{O}$  протягом 7 – ми днів  $t\ 4^{\circ}\text{C}$  при постійному перемішуванні 200 об/хв. Заміна  $\text{H}_2\text{O}$  проводилася кожні 12 годин. Наступним етапом були стабілізація та фіксація усіх отриманих зразків децелюляризованого перикарду у розчині 70% етанолу 24 год  $t\ 4^{\circ}\text{C}$  при постійному перемішуванні 200 об/хв. Потім всі фрагменти децелюляризованого перикарду відмивали у стерильному розчині NaCl протягом 24 год  $t\ 4^{\circ}\text{C}$  при постійному перемішуванні 200 об/хв.

### 2.2.1. Визначення/вимірювання (дослідження) біомеханічних властивостей децелюляризованого матриксу

Біомеханічні показники параметрів міцності сполучнотканинних структур є важливими і загальноприйнятими характеристиками біоматеріалу [48, 83, 116]. Вони характеризують міцність, пружність і пластичність матеріалу. Пружно-міцнісні властивості тканин перикарду ВРХ вивчали в лабораторії технічних випробувань ТОВ “Імпрув Медікел”. Тканини розтягували на універсальній деформаційній машині для проведення механічних випробувань «IMADA» (MX2 – 110, Японія). Використовували стандартні розміри зразків: сегменти перикарда –  $40 \times 40$  мм. Зразки кожного виду тканин міцно фіксували з двох сторін затискачами з абразивним покриттям до робочих частин пристрою. Потім цей додатковий пристрій кріпили до робочих затискачів деформаційної машини (рис. 2.2).

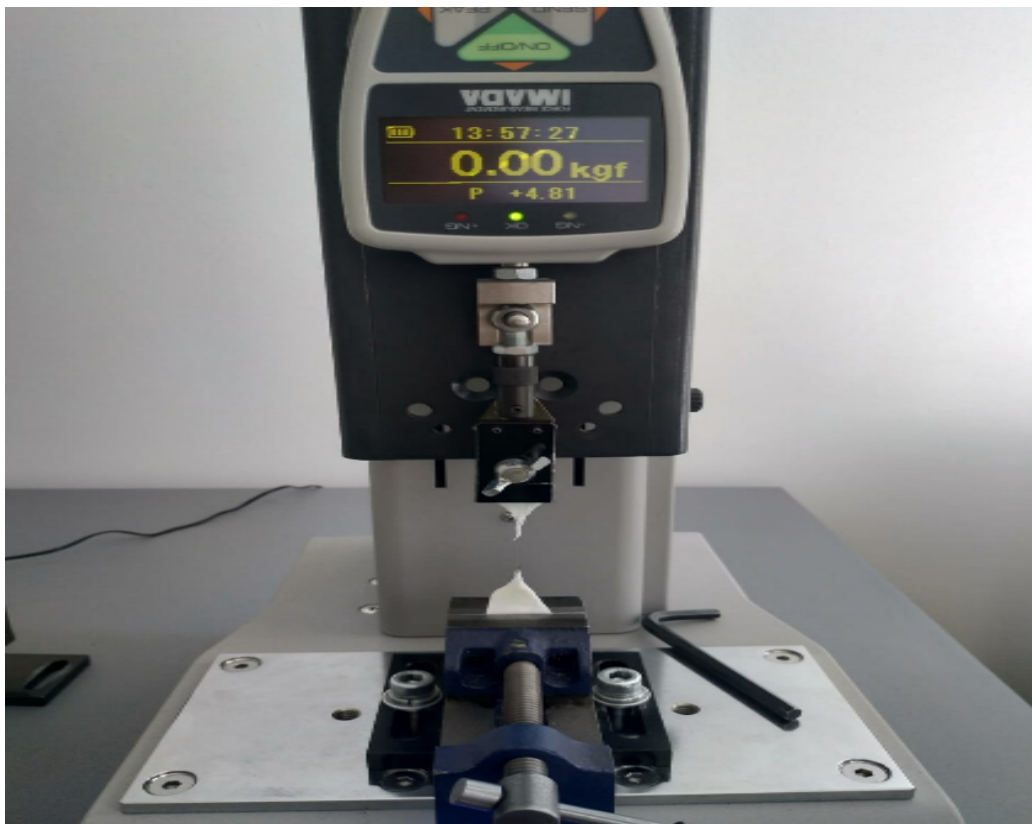


Рис. 2.2 Деформаційна машина «IMADA» (MX2 – 110, Японія);  $V = 60$  мм/хв;  
 $F = 4,0$  кг

З метою запобігання висихання досліджувані зразки зберігали в фізіологічному розчині. Товщину зразків вимірювали за допомогою товщиноміра «ТН-10-60» («Красный инструментальщик», Росія). З огляду на гістологічну структуру тканини перикарду розглядалися як анізотропний матеріал, і залежно від напрямку волокон (поздовжньому і поперечному) проводили його деформування. Швидкість деформації  $V$  складала 60 мм/хв, граничне значення навантаження  $F = 4,0$  кг. Зразки тканин були попередньо обумовлене завантаженням і розвантаженням при постійній швидкості 60 Н / м, подібно до фізіологічного навантаження листків аорти (Martin & Sun, 2012), і воно повторювалося протягом 10 циклів, поки петля напруги деформації зразка не виявилася періодичною.

Після вилучення зразків з рідини їх швидко розміщували на фільтрувальному (промокальному) папері для видалення надлишку вологи. Після зразок поміщали в верхній затискач таким чином, щоб він вільно звисав під дією власної маси і, направляючи рукою по лінії, перпендикулярній до зусилля розтягування, затискали у нижньому затискачі. Щоб уникнути прослизання або перекусування зразків в затискачах допускається застосовувати прокладки. При цьому кінці прокладок повинні знаходитися на рівні площин затискачів, що обмежують затискну довжину зразку.

Затискали зразок таким чином, щоб його поздовжня середня лінія проходила через центральну точку передніх кромek затискачів. Після того кінці зразків заправляли в затискачі і давали попередній натяг  $95 \pm г$ . Включали пристрій для реєстрації максимального зусилля і відносного максимального подовження. Приводил в рух рухливий затискач і розтягують зразок до моменту розриву.

Під час випробувань реєстрували:

а) максимальне розривне зусилля, Н;

б) подовження, мм, відносне максимальне подовження під час розриву, %.

Показники розривного зусилля і подовження при розриві фіксували після розриву зразків. Одновісне розтягнення продовжували до моменту порушення цілісності тканини, при цьому реєстрували показник межі міцності (максимальна напруга, яку здатний витримати зразок). Отримані дані виводили в цифровому вигляді на персональний комп'ютер.

За розривне зусилля приймали середньоарифметичне значення результатів всіх вимірювань. Обчислення здійснюють з похибкою до 0,196Н (0,02 кгс) і округлюють до 0,98 Н (0,1 кгс). Подовження зразків при розриві  $L_1$  (%) розраховували за формулою:

$$L_1 = L \cdot 100 / A,$$

де:

$L$  - подовження при розриві, мм;

$A$  - затискна довжина зразку, мм.

За подовження при розриві приймали середньоарифметичне значення всіх вимірювань. Обчислення здійснювали з похибкою до 0,01% і округлювали до 0,1%. Всі результати випробувань, отриманих при несиметричному розташуванні зразка за рахунок вислизання із затискачів або вислизанні більш ніж на 2 мм уздовж лінії затиску, відкидались. Реєстрації піддавались всі розриви, що трапилися в межах 5 мм від лінії затиску затискачів. Після закінчення п'яти випробувань перевіряли отримані результати. Якщо один з результатів «розриву в затискачі» був вище найменшого результату при «нормальному розриві», то такий результат враховували. Якщо один з результатів «розриву в затискачі» був нижче найменшого результату при «нормальному розриві», то такий результат виключали і виконували додаткові випробування для отримання п'яти «нормальних розривів».

Випробування на розтягнення дозволяє досить вірно судити про поведінку матеріалу і при інших видах деформації. Вивчення фізико-

механічних властивостей тканини включало визначення таких показників: товщина ( $h$ ); максимальна сила розтягнення внаслідок порушення цілісності матеріалу ( $F_{\max}$ ); [14, 15].

Біомеханічні характеристики відповідають міжнародним стандартам ISO (5840:2005 «Cardiovascular implants – Cardic valve prostheses»)

### **2.2.2. Фарбування препаратів гематоксилін еозином, Конго та триколором по Масону**

Підготовка зразків до фарбування проводилася шляхом фіксування ксеноперикарду у нейтральному (pH 7,4) 10% формаліні не менше ніж протягом щонайменше 3 днів при  $t$  4° С. Після фіксації із зразку вирізали фрагмент розміром 10x10 і помащали його в ємність із проточною водою не менше ніж на 6 год. Після того для обезводнення зразки оброблялися спиртом зі зростаючою концентрацією (50% і 60% по 4-6 годин; 70%, 80% і 90% по 8-12 годин; в 2-х порціях 100% спирту по 12-24 годин). Зневодненні зразки поміщали в чистий хлороформ на 1-1,5 години з дворазовою зміною хлороформу. Потім шматки поміщали в суміш хлороформу з парафіном (1:1) при температурі 37°С на 3-6 годин. Після просочування шматки викладали в силіконову форму і заливали парафіном. З парафінового блоку за допомогою мікротому Leica RM2125 робили зрізи товщиною 5-7 мкм. Зрізи фіксували на предметному скельці. Перед фарбуванням гістологічні скельця з метою депарафінізації поміщали в дві порції ксилолу на 2-4 хвилини в кожній порції. Для видалення ксилолу скельця поміщали в спирти по зменшенню концентрації: 96% - на 2-3 хвилини, 70% - на 2 хвилини. Залишки спирту видаляли за рахунок занурення в дистильовану воду на 2 хвилини.

*Фарбування гематоксилін-еозин.* Фарбування передбачає використання основного барвника гематоксиліну, що фарбує базofilні клітинні структури (ядро, рибосоми, РНК-багаті ділянки цитоплазми) в яскраво синій колір, та спиртового барвника кислого еозину, що фарбує еозинофільні структури



клітини (цитоплазму) в червоно-рожевий колір. Після вилучення скельця із дистильованої води на зріз за допомогою піпетки наносили 5-7 крапель гематоксиліну і витримують протягом 1-2 хвилин. Після видалення гематоксиліну скельце поміщали під проточну воду на 2 хвилини. Після цього скельце поміщали в еозин на 2-3 хвилини. Для зневоднення препарат поміщали в розчини зі зростаючою концентрацією спирту: 70% спирт – швидко 5-10 секунд; 96% спирт – протягом 2 хвилин. Після зневоднення на 2 хвилини поміщали в ксилол. Після ксилола препарат накривали покривним скельцем. На фарбований зріз наносили 1-2 краплі бальзаму і наносили покривне скельце.

*Фарбування Конго.* На фіксований препарат наносять Конго червоний (1% водний розчин) на 1-3 хвилини. Після чого препарат промивають водопровідною водою. Для диференціювання наносять 70 % або 80 % спирт до утворення блідо-рожевого кольору. Препарат знову промивають під водопровідною водою. Для фарбування ядер наносять квасцовий гематоксилін на 2-3 хвилини. Препарат промивають під водопровідною водою. Потім зневоднюють, висвітлюють і фіксують в смолу. В результаті фарбування отрмують ядра з синім відтінком і колагенові волокна з червоним.

*Фарбування триколом по Масону.* Гістологічні предметні скельця депарафінізуються звичайним способом та регідруються у низхідній серії концентрації за допомогою спирту. Слід дотримуватись зазначених умов, щоб гарантувати оптимальний результат фарбування. Для цього необхідно на предметне скельце з гістологічним препаратом нанести розчин для фарбування гематоксиліну заліза Вейгерта на 5 хв. Промивання під проточною водою протягом 5 хв. Нанести 1% розчин оцтової кислоти приблизно до 30 секунд. Після чого, не промиваючи водою, нанести реагент 1 (розчин азофлосину) на 10 хв. Повторити етап з оцтовою кислотою. Додати реагент 2 (розчин оранжевої G тунгстофосфорної кислоти) на 1 хв.

1% оцтова кислота на 30 секунд. Серія спиртового вимивання починаючи з найменшої концентрації 70 %-96%-100% спирт кожного з етапів по 30 секунд. Фіксація 100 % спиртом протягом 2 хвилин. Покрити препарат ксилолом на 5 хв і накрити покривним скельцем.

Пофарбовані зразки досліджували за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX51.

### **2.2.3. Фарбування за методом DAPI**

Фарбування DAPI (4', 6-діамідино-2-феніліндол, дигідрохлорид) проводили безпосередньо шляхом інкубації зразка тканини (просвітна сторона вгору) з 25 мкг/мл DAPI, розведеного в PBS протягом 2 хв (у темряві). Досягнення максимальної товщини тканини, адвентицію та середній шар видаляли за допомогою підходу, запропонували Jelev et al. [88]. ЕСМ фіксували на пластині щипцями під мікроскопом. Інтимний шар ретельно видаляли, розтягуючи його щипцями, одночасно з різанням по краях скальпелем, з подальшим відновленням у PBS. Плями DAPI також застосовували на вкладених у парафін поперечних перерізах (товщина 5 мкм), дотримуючись стандартних протоколів фіксації, зневоднення, вкладання, різання, депарафінізації, регідратації та фарбування.

### **2.2.4. Спектрофлуометричний метод визначення концентрації нуклеїнових кислот**

Екстракцію ДНК проводили за допомогою набору ДНК Easy Blood and Tissue (Qiagen, Німеччина). 10-25 мг тканини як з вихідних матеріалів перед децелюляризацією, так і з децелюляризованими зразками коротко обробляли протеїназою K, щоб кількісно визначити загальну кількість нуклеїнової кислоти нг/мг сухої тканини та розрахувати відсоток видалення ДНК після децелюляризації. Вимірювання флуоресценції (фотонів в секунду) проводили при кімнатній температурі в приміщенні,  $t$  23-24 ° C, використовуючи

спектрофлуориметр для підрахунку фотонів Qubit 3.0. Межа виявлення ДНК становила 0,2 нг / мкг нуклеїнової кислоти.

### **2.3. Стабілізація децелюляризованого матриксу методом зшивання NHS/EDC**

Додатковим етапом хімічної децелюляризації було застосування методу крос – лінкінгу. Цей етап реалізувався за допомогою обробки зразків розчином EDC/NHS (10 мМ 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіїмід, 10 мМ гідроксисукцинімід-2, 0.05 М етансульфонова кислота) та MES розчином, рН 5.6 (0.05 М етансульфонова кислота) протягом 12 годин при  $t$  24°C, 50 об/хв [89, 99, 130, 150]. Завершаючим етапом процесингу було відмивання зразків усіх дослідних груп у 0,9 % розчині NaCl протягом 24 годин,  $t$  4°C, 200 об/хв.

### **2.4. Визначення цитотоксичності**

Визначення цитотоксичного ефекту досліджуваного матеріалу проводили методом прямого контакту відповідно до міжнародного стандарту ISO 10993-5-2011 “Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 5. Tests for in vitro\* cytotoxicity”.

Для якісного визначення ступеню цитотоксичності із отриманого біотехнологічного матеріалу було вирізано 5 фрагментів площею близько 8-10 мм<sup>2</sup>. За стандартних умов на них було посіяно клітини іморталізованої лінії фібробластів, трансфєкованих флуоресцентним білком мітохондріальної локалізації.

Посів клітин здійснювали шляхом нанесення на зволожений стандартним ростовим середовищем (DMEM + 10% сироватки) фрагмент концентрованої суспензії обсягом 150 мкл. Кількість посіяних клітин на фрагменти складала: 300 тис. Після первинної інкубації клітин у суспензії протягом 15 хв, для просочення фрагментів, їх переносили до стандартного 6-лункового планшету для культури тканин, та занурювали у

стандартне ростове середовище. Культивування тривало протягом 2-х тижнів, з регулярним моніторингом та заміною середовищ. Після першого тижня проводився контроль наявності живих клітин за допомогою флуоресцентного мікроскопу Olympus BX40, порівнюючи кількість та розташування клітин.

Якісна оцінка проводиться за допомогою мікроскопічного дослідження клітини, для оцінки змін загальної морфології, вакуолізацію, лізис клітин та цілісність мембрани. Відхилення від нормальної морфології реєстрували у звіті про результати дослідження описово або цифрами. В таблиці 2.1 запропонований зручний спосіб оцінки досліджуваних матеріалів.

*Таблиця 2.1*

#### **Оцінка досліджуваних матеріалів по шкалі цитотоксичності**

<b>Шкала цитотоксичності</b>	<b>Інтерпретація</b>
0	Не цитотоксичний
1	Легка цитотоксичність
2	Середня цитотоксичність
3	Значна цитотоксичність

### **2.5. Визначення біосумісності матеріалів**

Імплантацію зразків експериментальним тваринам здійснювали під шкіру в ділянку міжлопаткового простору за методом Fishbein M. et al. (1982) [65]. Для цієї ділянки характерні мала рухливість і недоступність для тварини. Це мінімізує ймовірність втручання тварини в експериментальний процес. Морфологічні особливості підшкірної жирової клітковини людини і щурів подібні за деякими параметрами, а саме: пухка сполучнотканинна основа, пориста будова, щільність кровоносних судин [5]. Експеримент

проводили на 4–5-місячних самцях щурів лінії Вістар ( $n = 15$ ) масою 190–230 г. З поверхні шкіри щурів у зоні операційного поля видаляли шерсть і обробляли 70%-м розчином етилового спирту. Операцію проводили в стерильних умовах під внутрішньом'язовим наркозом з використанням ксилазину («Alfasan», Нідерланди) в дозі 1 мг/кг маси тіла у комбінації з кетаміном (Біолік, Україна) у дозі 10 мг/кг. На спині тварини робили розріз завдовжки 2 см і формували підшкірні кишені за допомогою загостреного шпателя, відокремлюючи підшкірні тканини від м'язового шару.

У просвіт кишені поміщали підготовлені імпланти розміром  $1 \times 1$  см, які фіксували по кутах до м'язової тканини вузловими швами «Polypropylene» («Голніт», Україна). Розріз шкіри зашивали обвивним безперервним швом, ниткою, яка не розшаровувалася, обробляли антисептиком – розчином 1% «Брильянтового зеленого» («Галичфарм», Україна). Після завершення хірургічної маніпуляції всі тварини зберігали фізіологічну активність. Проводили щоденне спостереження за загальним станом тварин (ГОСТ Р ІСО 10993) після операції, а також за станом післяопераційного шва не показало реакцій запалення, гнійних ускладнень або інших відповідей організму на імплантовані матеріали.

У встановлений термін після імплантації зразків, через 3 місяці - дослідних та контрольних тварин виводили із експерименту. Комплекс тканин лопаточної ділянки щурів (разом із імплантованою структурою) вилучали та досліджували мікроскопічно (рис. 2.3).

Для дослідження гістологічних змін структури біоімпланту та наявності тканинної реакції організму, після підшкірної імплантації лабораторним тваринам, дослідним матеріалом слугували експланти децелюляризованого перикарду із прилеглими до нього тканинами.

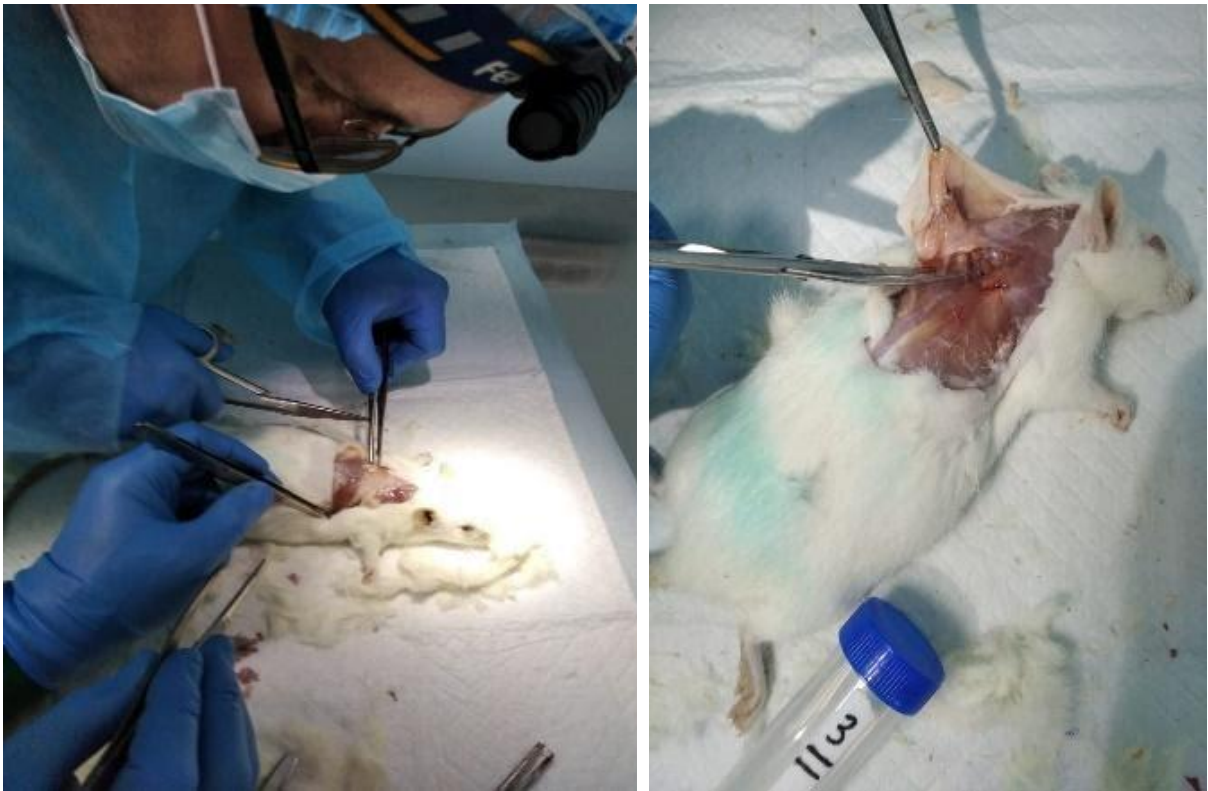


Рис. 2.3. Операції експлантації досліджуваних зразків тканинних лоскутів з підшкірної ділянки міжлопаткового простору.

Дослідження проводили мікроскопічно через 3 місяці експерименту. Під час дослідження даних зразків описували структуру сполучної тканини (щільність, клітинність, васкуляризація) та прилеглої тканини. Важливо було встановити, зберігає трансплантат структурну цілісність або піддається фрагментації та резорбції, оскільки ці фактори дозволяють встановити, наскільки швидкими будуть васкуляризація і зміна клітинних асоціацій із поліморфноклітинної на лімфомакрофагальну, а у подальшому і на фібробластичну. Тим самим визначаються час і швидкість формування колагенових волокон капсули, яка є бар'єром і сполучною ланкою між трансплантатом і тканинами реципієнта [26, 27]. Для отримання більш об'єктивних даних проводили напівкількісну оцінку вираженості запальної реакції: 0 – відсутність ознак; + – поодинокі клітини (нейтрофіли, лімфоцити,

макрофаги, еозинофіли); ++ – невеликі фокуси; +++ – окремі та зливні фокуси; ++++ – великі інфільтрати.

## **2.6. Методи математичного аналізу та статистичної обробки отриманих даних**

Аналіз результатів дослідження проводився з використанням методів біостатистики [6, 20]. Для кількісних показників проводився аналіз розподілу на нормальність з використанням критерію Шапіро-Уїлка, розраховувалося їх середнє значення ( $M$ ) та стандартне відхилення ( $\pm SD$ ). Для оцінки середнього значення розраховувався його 95% довірчий інтервал (95% ДІ). Для якісних показників розраховувалася частота (%) та, у разі необхідності, 95% ДІ. При проведенні порівняння кількісних ознак в більше ніж двох груп використано однофакторний дисперсійний аналіз [6], постеріорні порівняння проводилися з використанням критерію Шеффе (закон розподілу не відрізнявся від нормального). Для порівняння якісних ознак використовувався критерій хі-квадрат, постеріорні порівняння для більше ніж двох груп проводилося з урахуванням поправки Бонферроні [6].

При проведенні аналізу використані критерії з двосторонньої критичної областю, критичний рівень значимості прийнятий рівним 0,05. Статистичний аналіз результатів дослідження проводився в пакеті статистичного пакету EZR v. 1.54 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan, 2020) [94], що представляє графічний інтерфейс до R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

### **РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ОСНОВ ВИГОТОВЛЕННЯ БІОІМПЛАНТУ**

#### **3.1. Порівняльна оцінка методів/способів отримання децелюляризованого матриксу**

Для створення біоімпланту із перикарду ВРХ з наукової літератури було відібрано найпоширеніші методи децелюляризації. Однак описані у літературі [120, 121, 135, 143, 147, 148, 159, 161] протоколи не забезпечували відтворювані результати й призводили до неприпустимої деградації структури перикарду ВРХ, тому постала задача синтезу оригінальних модифікацій протоколу виготовлення біоімпланту. Детальний аналіз кожного з етапів дозволив нам модифікувати технології та отримати ДПМ для подальшого тестування на біологічні, біомеханічні, цитотоксичні та біосумісні властивості.

На першому етапі дослідження біологічний матеріал (перикардіальна сумка великої рогатої худоби) транспортували в лабораторію, де проводилась попередня обробка зразків та їх відбракування. Кожен шматок тканин акуратно обрізали ножицями, відокремлюючи перикардіальні зв'язки і видаляли залишки жирової тканини. До відбракування відносили перикард з вираженими дефектами, такими як нерівномірна товщина, подряпини, складки, вмятини, бляшки, тощо. Після того лоскути піддавалися витримуванню протягом 24 год в гіпертонічному середовищі зі зростаючою концентрацією для очищення від крові та екстракції водорозчинних білків.

За основу було взято спосіб підготовки біотканин для ксенопротезування із даних наукової літератури [120, 121, 135, 143, 147, 148, 159, 161]. Технологія виготовлення децелюляризованого позаклітинного матриксу (ДПМ) багатостадійний процес і складалася з наступних етапів:

- осмотичний шок,
- децелюляризація,



- детоксикація,
- стабілізація та фіксація,
- відмивання.

Суть запропонованих методик полягає у тому, що тканина перикарду після витримання у гіпертонічних розчинах піддається обробці протеолітичними ферментами та/або детергентами. Підбір оптимальних умови дії ферменту/детергентів (температура, рН, концентрація) дозволяє зберегти фібрилярні білки і повністю зруйнувати клітинні елементи. Всі залишкові компоненти клітини, водорозчинні білки та кінцеві телопептиди колагену, що являються антигенними молекулами, вимиваються із матриксу при інкубації в середовищі з різним осмотичним тиском. При цьому архітектоніка і тинкторіальні властивості колагену та еластину зберігаються. У всіх запропонованих методиках наступним етапом є стабілізація матриксу за допомогою розчину глутарового альдегіду, що зшиває між собою поліпептиди колагенових волокон і робить тканину більш цілісною, міцною та гнучкою. У підсумку після біотехнологічної трансформації тканини отримується позаклітинний матрикс, що являє собою очищений біополімер із структурних білків. Однак, при недостатній відмивці глутарового альдегіду часто спостерігається явище кальцифікації імплантованого ДПМ, що може призводити до порушення функціональності біоімпланту і його подальшої заміни [146]. Також, даний агент володіє цитотоксичною дією, що може негативно впливати на клітини донора при залишковій його кількості на біопротезі [84].

Модифіковані технології виготовлення ксеноперикарду склалися шляхом зміни і подальшого комбінування основних параметрів обробки. Нами було виділено наступні ключові стадії, що потребували модифікації:

- концентрація детергенту/ферменту та їх комбінація;
- тривалість процесингу;
- температура інкубації;

- заміна стабілізуючого агенту.

*Концентрація детергенту/ферменту.* У якості миючих засобів використовували іоногенний додецилсульфат натрію (SDS, Sodium Dodecyl Sulphate), неіоногенний тритон X-100, що зазвичай використовується разом з гідроксидом амонію та ферментом трипсин, що виступає як додатковий агент. Концентрація зазначених вище агентів при децелюляризації тканини в свою чергу впливає на 2 параметри, що тісно пов'язані один з одним – це руйнування клітинних компонентів і збереження цілісності структурних волокон. Для визначення «робочих концентрацій» було проведено експеримент із обробкою тканини перикарду із різними концентраціями детергентів при однаковій температурі та тривалості. Дослідження на відібраних зразках проводилось з різними концентраціями від низької до високої. Результати оцінювали за гістологічними препаратами пофарбованими гематоксилін-еозином. Основними критеріями вибору результатів були відсутність клітинних елементів та збереження структури колагенових та еластинових волокон. Результати представлені в таблиці 3.1.

*Таблиця 3.1*

**Результати дослідження з вивчення впливу концентрацій миючих агентів на стан перикарду ВРХ**

<b>Реагенти</b>	<b>Концентрація, %</b>	<b>Наявність клітинних елементів</b>	<b>Стан структури волокон</b>
<b>Додецилсульфат натрію</b>	0,01	Поодинокі клітини*	Еластинові – без змін Колагенові – без змін
	0,1	Відсутні	Еластинові – без змін Колагенові – без змін

Продовження таблиці 3.1.

Реагенти	Концентрація, %	Наявність клітинних елементів	Стан структури волокон
<b>Додecilсульфат натрію</b>	0,01	Поодинокі клітини*	Еластинові – без змін Колагенові – без змін
	0,1	Відсутні	Еластинові – без змін Колагенові – без змін
	1	Відсутні	Еластинові – частково порушені * Колагенові – частково порушені*
	2	Відсутні	Еластинові – сильно порушенні* Колагенові – сильно порушені*
<b>Тритон Х-100 + 0,1% Гідроксид амонію</b>	0,1	Поодинокі клітини*	Еластинові – без змін Колагенові – без змін
	1	Поодинокі клітини*	Еластинові – без змін Колагенові – без змін
	2	Відсутні	Еластинові – без змін Колагенові – без змін
<b>Трипсин</b>	0,01	Значна кількість клітин*	Еластинові – без змін Колагенові – без змін
	0,25	Велика кількість клітин	Еластинові – без змін Колагенові – без змін

\*позначено результати які не відповідають вимогам до біоімплантів

Як видно, із результатів, при використанні 0,1 % детергенту додецилсульфату натрію при постійній температурі однакового проміжку часу теоретично можливо отримати біоматеріал, що відповідає вимогам до біоімплантів. Однак, більш високі концентрації призводили до часткового порушення колагенових та еластинових волокон. Комбінація реагентів Тритон Х-100 + 0,1% Гідроксид амонію показала свою неефективність при використанні більш низьких концентрацій, за яких клітинні компоненти не руйнувалися. Така ж динаміка спостерігалась і при використанні ферменту трипсину. На основі проведених досліджень, було запропоновано сформувати комбінації децелюляризуючих компонентів (таб. 3.2)

Таблиця 3.2

**Результати дослідження з вивчення впливу концентрацій комбінації  
м'яких агентів на стан перикарду ВРХ**

Реагенти	Наявність клітинних елементів	Стан структури волокон
1% Додецилсульфат натрію + 2% Тритон Х-100 + 0,1% Гідроксид амонію	Відсутні	Еластинові – без змін Колагенові – без змін
1% Додецилсульфат натрію + 0,25 трипсин	Відсутні	Еластинові – без змін Колагенові – без змін

Результати експерименту показали, що використання 1% додецилсульфату натрію в комбінації з Тритон Х-100 і Гідроксидом амонію, а також в поєднанні з трипсином теоретично можливе для створення біоімпланту із перикарду ВРХ.

Таким чином на основі підбраних реагентів та їх концентрацій було створено технологічні схеми, які піддавалися подальшій модифікації по фізичним параметрам:

Технологія 1 – Гідроксид амонію + Тритон X-100;

Технологія 2 - 1% Додецилсульфат натрію + гідроксид амонію + Тритон X-100;

Технологія 3 - 1% Додецилсульфат натрію;

Технологія 4 - Трипсин + 1% Додецилсульфат натрію;

Технологія 5 - 0,1 % Додецилсульфат натрію.

*Тривалість процесингу.* На першому етапі біотехнологічної трансформації тканини проводиться осмотичний лізис, що має на меті руйнування цілісності структури клітини для забезпечення в подальшому кращого кліренсу її компонентів. Simoes I.N. та колеги запропонували для проведення даного етапу поміщати тканини в стерильну дистильовану воду при зниженій температурі  $t\ 4^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв. Однак за таких умов нам не вдалося в повній мірі провести лізис клітин. Тому експериментальним шляхом було збільшено часовий проміжок фізичного методу осмотичного шоку до 72 год.

Децелюляризація тканини, тобто отримання позбавленого від клітин міжклітинного матриксу, являється однією з основних методик в сучасній регенеративній медицині. Так як даний процес дозволяє зберегти склад, тривимірну структуру, біологічну активність міжклітинного матриксу. Такий матрикс слугує прекрасним матеріалом для подальшої клітинної адгезії, диференціації та проліферації клітин та тканин донора. Ми протестували 5 різних технологій децелюляризації на виявлення клітин та їх компонентів за допомогою гістологічного методу (табл 3.3.).

Таким чином, було встановлено оптимальний час обробки дергентами та ферментом, за якого спостерігалась повна відсутність клітинних компонентів.

Таблиця 3.3.

**Результати дослідження з встановлення оптимального часу  
децелюляризації перикарду ВРХ**

<b>Досліджувана група</b>	<b>Тривалість децелюляризації, кількість днів</b>	<b>Наявність клітинних компонентів</b>
<b>Технологія 1</b>	28	відсутні
<b>Технологія 2</b>	28	відсутні
<b>Технологія 3</b>	14	відсутні
<b>Технологія 4</b>	14	відсутні
<b>Технологія 5</b>	21	відсутні

*Температурний режим.* Для проведення процесу децелюляризації використовували температуру холодильника +4°C та кімнатну температуру +24°C.

*Крос-лінкінг.* Одним з головних завдань нашого дослідження було створення методики децелюляризації, яка б була вільною від використання глутаральдегіду. Для заміни стабілізуючого компоненту нами було вирішено взяти методику зшивання колагену, що застосовують в медицині при лікуванні катаракти та очних хвороб. Для формування додаткових поліпептидних зв'язків було застосовано розчинний карбодіїмід 1-Етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодіїмід та органічну речовину, похідну проліну, N-гідроксисукцинімідом. Для стабілізації процесу «зшивання», реакцію проводять в буфері MES (2-(N-морфоліно)етансульфонова кислота). Ефективність використання даної методики оцінювали за результатами біомеханічних властивостей. Оцінювання результатів проводили порівнюючи з контролем (табл. 3.4)

Таблиця 3.4.

**Результати дослідження впливу безглутаральдегідового крос-лінкінгу на біомеханічні властивості децелюляризованого перикарду ВРХ,  $M \pm SD$**

Показник	Нативний перикард (n=5)	Технологія 1 (n=5)	Технологія 2 (n=5)	Технологія 3 (n=5)	Технологія 4 (n=5)	Технологія 5 (n=5)
Максимальна сила на розрив, кгF	6,29 $\pm$ 0,70	4,04 $\pm$ 0,73*	3,51 $\pm$ 0,49*	1,33 $\pm$ 0,75*	7,28 $\pm$ 0,46	9,55 $\pm$ 0,66*

Примітки: для порівняння між групами використано дисперсійний аналіз, постеріорні порівняння проводилися за критерієм Шеффе

\* – відмінність від показника нативного перикарду ВРХ статистично значима,  $p < 0,05$ .

Отримані дані, підтверджують ефективність застосування модифікованого методу стабілізації децелюляризованого матриксу, про що свідчить підвищення ( $p < 0,05$ ) біомеханічних властивостей в окремих Технологіях.

*Технологія 1.* За даними, що були взяті за основу розробки методу, зразки ксеноперекардіальної тканини обробляли наступним чином. Після первинної обробки зразки піддавали етапу осмотичного лізису у дистильованій воді при температурі +4°C. Після чого тканину поміщали 0,1% Гідроксид амонію та 1% неіонний детергент Тритон Х-100 при зниженні температури до 4°C протягом 30 днів при постійному перемішуванні 60 об/хв [147, 161]. В результаті експерименту було вдвічі підвищено концентрацію хімічних розчинів, гідроксиду амонію до 0,2%, а тритон Х-100 до 2%. Збільшено тривалість процесингу до 42 діб та більш ніж втричі швидкість перемішування (200 об/хв).

Основними миючими реагентами, що використовувалися в *Технології 2* були 0,2 % Гідроксид амонію, 2 % Тритон Х-100 та 1% іонний детергент додецилсульфат натрію. Фізичні параметри: температура + 4°C, постійне перемішування при 200 об/хв протягом 30 днів [147, 161]. Очистка тканини перикарду була вищою при продовженні часу децелюляризації до 42 днів.

Модифікація *Технології 3* полягала у збільшенні тривалості процесу з 5 до 14 днів та підвищення швидкості помішування до 200 об/хв. В той час як колеги [147, 159] поміщали оброблені тканини у холодильник, ми вирішили проводити даний етап за кімнатної температури +24°C.

В основу *Технології 4* було покладено використання ферментної очистки трипсином з хелатуючим агентом ЕДТА та 1% SDS. Було змінено температурний режим і підвищено його до +24°C.

Для *Технології 5* також було змінено температурний режим до +4°C. Час очистки 0,1 % додецилсульфатом натрію становив 35 діб.

Однією з найсуттєвіших змін у всіх технологіях було внесення додаткового процесу зшивання тканин після дії детергентів – крос-лінкінгу.

Таким чином, ми створили оптимальні умови для всіх технологій і внесли наступні модифікації (рис.3.1):

- осмотичний шок – тривалість до 3-х днів;
- децелюляризація – підбір оптимальних концентрацій детергентів, тривалості та температурного режиму процесу;
- детоксикація;
- стабілізація та фіксація;
- крос-лінкінг – стабілізація ДПМ методом зшивання NHS/EDC – MES (10 mM 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодиимид, 10 mM гідроксисукцинімід - 2, 0.05M етансульфонова кислота), що забезпечує підтримання архітекτονіки і біомеханічних властивостей децелюляризованого перикарду ВРХ;
- відмивання.



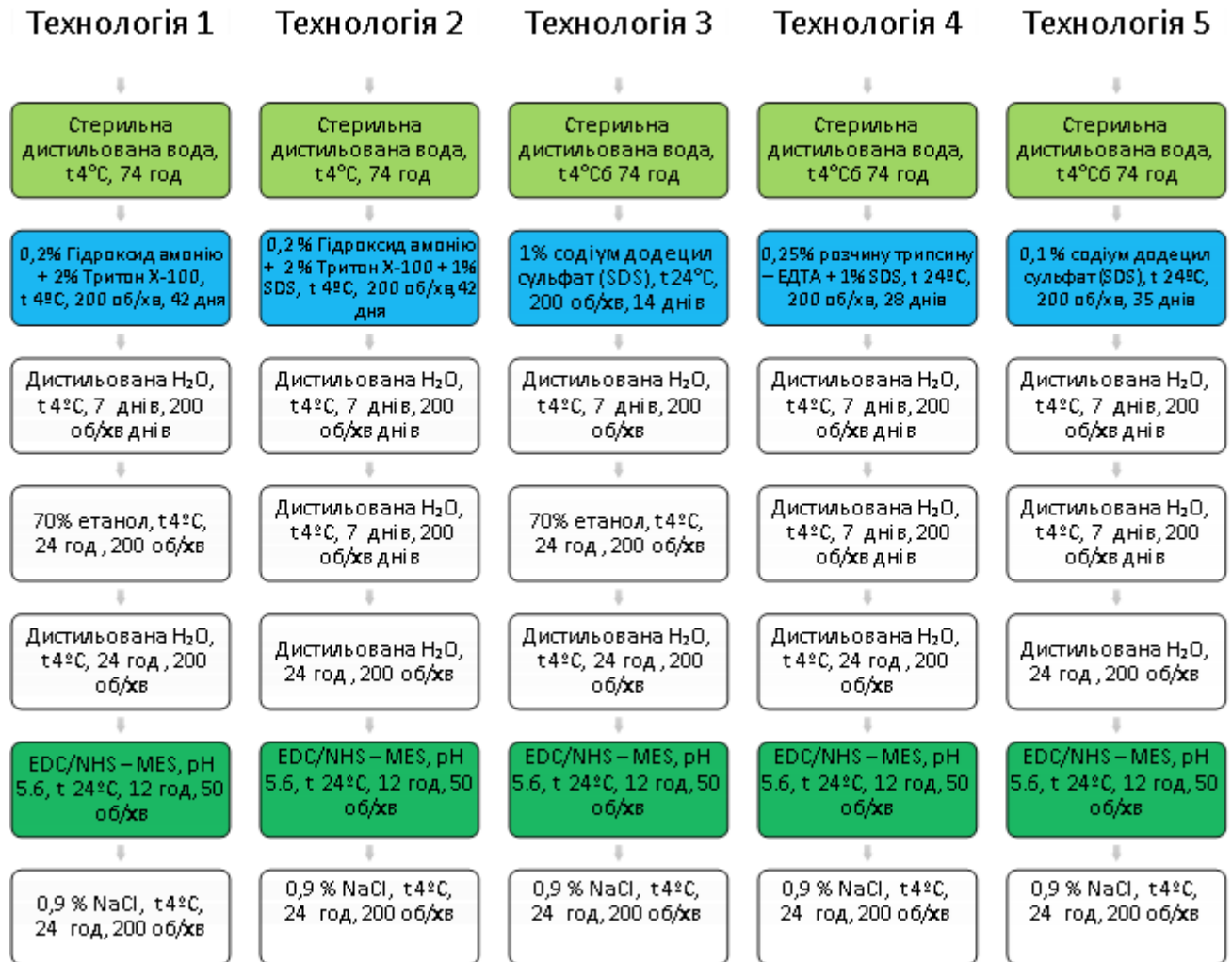


Рис. 3.1 Модифіковані протоколи технологій виготовлення ДПМ перикарду ВРХ.

Таким чином, для подальших експериментальних досліджень було сформовано 5 модифікованих технологій.

### 3.1.1. Характеристика біомеханічних властивостей децелюляризованого матриксу

Досліджено зміну біомеханічних властивостей матриксу перикарду ВРХ в залежності від концентрації детергентів, що використовувалися для децелюляризації. Для реєстрації значення міцності матеріалу на розрив (кгс),

зразки піддавали деформації на розривній машині «IMADA» (MX2 – 110, Японія).

В результаті дослідження біомеханічних властивостей децелюляризованого матриксу спостерігали найнижчий рівень міцності ( $F_{\max}$ ) у зразках Технології 3 ( $1,33 \pm 0,75$  кгс), що в 5 разів нижче ( $p < 0,01$ ), ніж показники нативного перикарду ( $6,84 \pm 0,70$  кгс) в продольному напрямку та майже в 4 рази нижче у поперечному ( $0,88 \pm 0,19$  кгс) порівняно з контролем ( $3,78 \pm 0,36$  кгс) (рис. 3.2).

Порушення архітекτονіки колагенових та еластинових волокон внаслідок дії жорсткої дії детергента SDS у досить високій концентрації при кімнатній температурі по відношенні до тканин перикарда може бути причиною таких низьких результатів біомеханічних тестів. Усі інші використовувані підходи для децелюляризації забезпечили більш відповідні біомеханічні властивості. Значення міцності тканини на розрив у зразках Технологій 1 та 2 були приблизно однаковими, але в 1,5 та 1,8 рази нижче, ніж у контролі відповідно ( $p < 0,05$ ). Крім того, ми повинні відзначити, що зразок Технології 5 показав найвищий рівень  $F_{\max}$  ( $9,55 \pm 0,66$ ,  $p < 0,05$ ), що може бути пов'язано з менш тривалим впливом децелюляризуючих розчинів. Значення максимальної міцності на розрив у зразках Технології 5 були в 1,5 рази вищими, ніж у контрольній групі. На думку автора, зменшення концентрації SDS та проведення кросс-лінкінгу для децелюляризованих тканин визначає міцність отриманого скафолду.

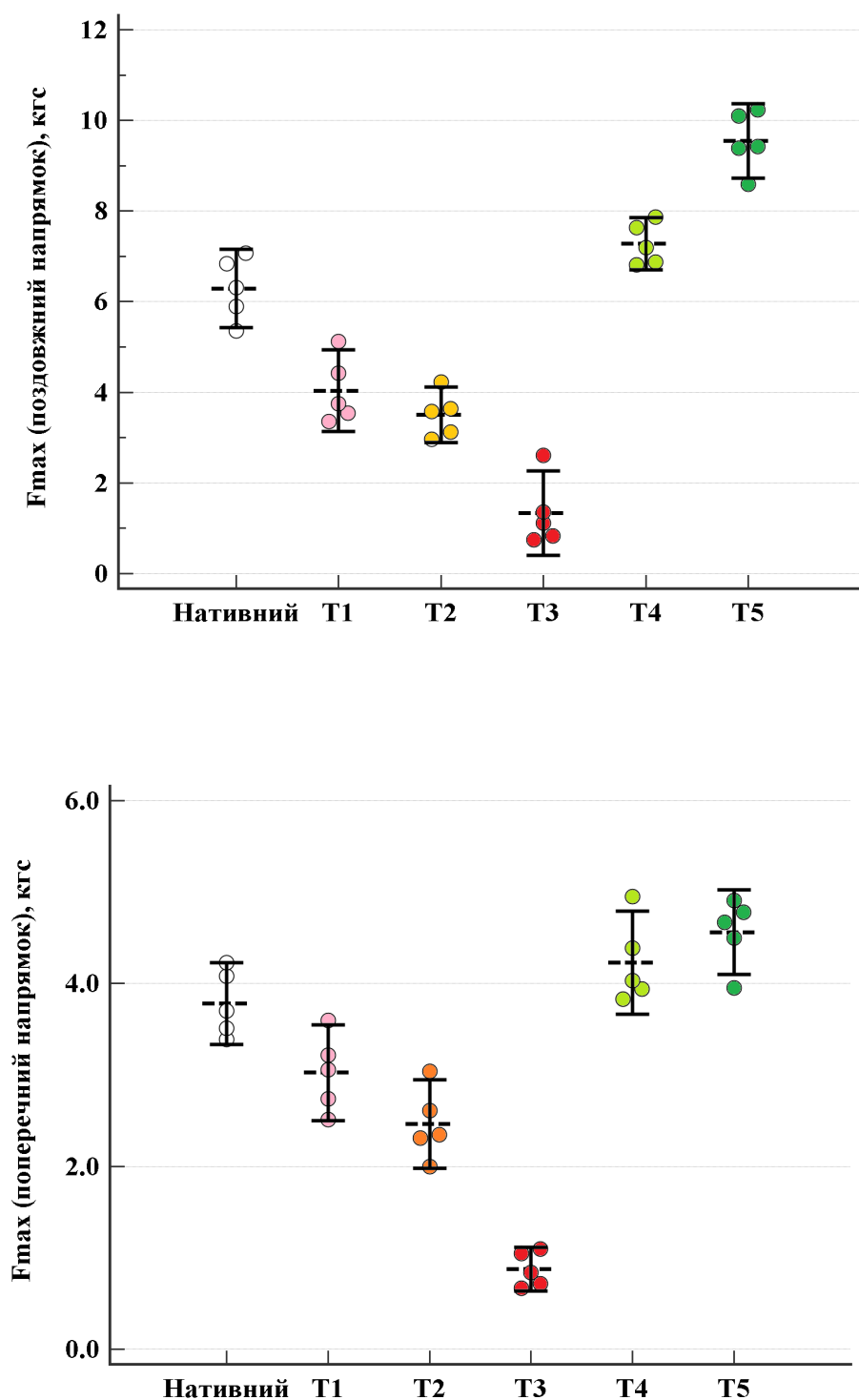


Рис. 3.2 Порівняння максимальної сили на розрив  $F_{max}$  (кгс) децелюляризованого перикарду ВРХ (повздожній та поперечний напрямки), отриманого за використання різних технологічних схем: Нативний – перикард ВРХ у якості контролю; T1 -Технологія 1 – перикард ВРХ,

децелюляризований гідроксидом амонію та тритон X-100; T2 - Технологія 2 – перикард ВРХ, децелюляризований гідроксидом амонію, тритон X-100 та 1% SDS; T3 - Технологія 3 – перикард ВРХ, децелюляризований 1% SDS; T4 - Технологія 4 – перикард ВРХ, децелюляризований 1% додецил сульфатом натрію та ферментом трипсином; T5 - Технологія 5 – перикард ВРХ, децелюляризований 0,1% SDS. Вказані середні значення та 95% ДІ.

### **3.1.2. Оцінка якості процесу децелюляризації зразків перикарду великої рогатої худоби**

Для оцінки якості процесу децелюляризації необхідно провести ряд тестувань на явність/відсутність у децелюляризованих органах клітин та клітинних компонентів, включаючи цитоплазму і ядро. Адже їх присутність у ДПМ може сприяти порушенню клітинної біологічної сумісності *in vitro* та викликати побічні реакції в умовах *in vivo* при подальшій рецелюляризації [71]. Оскільки неможливо на 100% видалення клітинних коппонентів після процесу децелюляризації, проте існують різні методики для кількісної оцінки таких компонентів як ДНК, мітохондрії або мембранно-асоційовані молекули, наприклад, фосфоліпіди. На сьогодні порогова концентрація залишкового клітинного матеріалу в ДПМ, що може бути достатньою для розвитку негативного ефекту, детально ще не вивчена і може змінюватися в залежності від виду ксенотканини, типу тканини, в яку імплантований матрикс, та імунної системи реципієнта. В даний час не визначені кількісні критерії ефективності децеллюляризації. На основі проведених раніше результатів досліджень, в яких вивчався розвиток ремоделюючого ефекту та виникнення побічної реакції на клітинному та організмовому рівнях, були запропоновані наступні мінімальні критерії для оцінки ефективності децеллюляризації [55, 67]:

- відсутність видимого ядерного матеріалу в зрізах тканини, забарвлених гематоксиліном і еозином або 4', 6-діамідино-2-феніліндолом (DAPI).

- <50 нг двохланцюгової ДНК в 1 мг сухої ваги позаклітинного матриксу;

Таким чином, якісна оцінка децелюляризації проводиться шляхом рутинних морфологічних методів, а кількісне визначення нуклеїнових кислот дає можливість оцінити залишок ядерних елементів клітин, що візуально не детектуються.

### **3.1.2.1. Використання методу фарбування гематоксилін еозином для виявлення клітинних компонентів у зразках децелюляризованого матриксу**

Для визначення рівня життєдіяльності клітин та ступеня пошкодження сполучнотканинних структур перикарду при процесі децелюляризації проводили гістологічні дослідження. Спостереження за морфологією тканини тривало протягом 2 місяців.

У якості контролю використовували нативний перикард великої рогатої худоби, що був у вигляді вузької пластинки із товстими колагеновими і тонкими еластиновими волокнами, та з щільно оформленою сполучною тканиною. У зразку нативного перикарду фіксували в невеликій кількості фібробласти веретеновидної форми з паличкоподібним помірно базофільним ядром і слабо базофільною цитоплазмою (рис. 3.3, А). Структура колагену нагадувала щільні звиті пучки, що розташовувались в паралельному напрямку один до одного. Така архітектоніка волокна забезпечує стійкість перикарду до механічної напруги.

При гістологічному дослідженні при фарбуванні зразків гематоксилін-еозином спостерігали повну відсутність клітин в матриксі Технології 1 та Технології 2 на 28 день культивування (рис. 3.3, В, С). Було відмічено характерні зменшення звивистості волокон та їх компактне розташування. В той же час цілісність, безперервність і просторове орієнтування не порушені.

Однак ми помітили, що тканина перикарда суттєво змінилася у Технології 3 (1% SDS при  $t$  24°C), де візуально фіксувалась зміна структури колагенових та еластинових волокон (рис. 3.3, D). Сполучнотканинні

структури даної групи мали виражені відмінності структури від попередніх досліджуваних груп тканин. Фібрили по всій товщі тканин мали паралельне розташування з широкими міжпучковими просторами, та наявністю значних порожнинних структур, що створило ефект пористості матриксу. Очевидно, така концентрація іонного детергента SDS в температурному режимі  $t\ 24^{\circ}\text{C}$  негативно впливає на тканинні волокна. Однак, спостерігалось видалення всіх клітин вже через 14 днів децелюляризації. Отриманні результати знайшли підтвердження в попередніх дослідженнях, де при фарбуванні за методом гематоксилін-еозин також не було виявлено фіолетово (базофільно) зафарбованих клітин після етапу очистки тканини даним детергентом [147, 159].

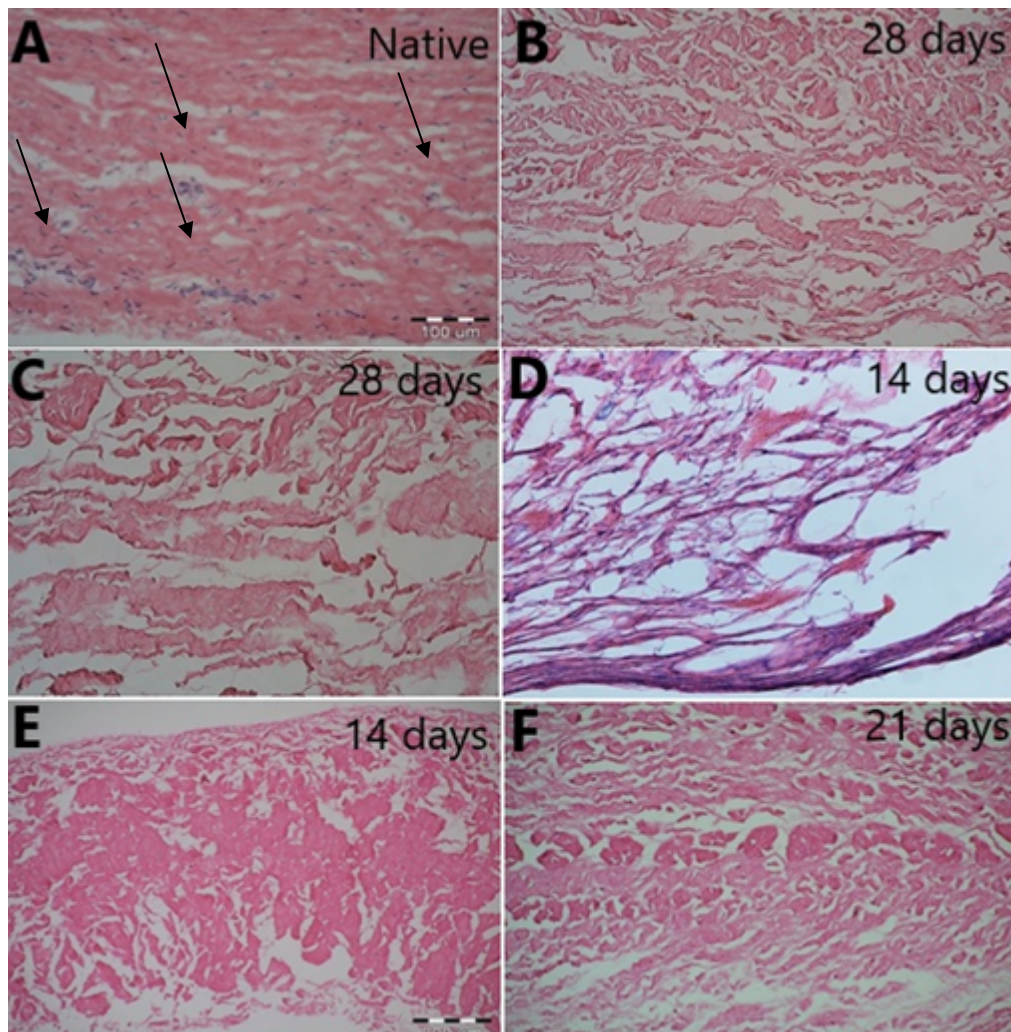


Рис. 3.3 Гістологічні зразки перикарду ВРХ децелюляризованого за різними біотехнологічними протоколами (фарбування гематоксилін-еозин, світлова мікроскопія, x200). А – нативний перикард, базофільно зафарбовані клітини (x100); В – елімінація клітин ДПМ за Технологією 1 через 28 днів процесингу; С – елімінація клітин ДПМ за Технологією 2 через 28 днів процесингу; D – елімінація клітин ДПМ за Технологією 3 через 14 днів процесингу; Е – елімінація клітин ДПМ за Технологією 4 через 14 днів процесингу; F – елімінація клітин ДПМ за Технологією 5 через 21 день процесингу.

Також ми фіксували відсутність ядерних елементів зі збереженням структури матриксу в Технології 4 після двох тижнів очистки (рис. 3.3, Е). Такий же ефект спостерігався у Технології 5 через 21 день обробки (децелюляризації) (рис. 3.3, F). У зразках даних Технологій структура перикарду була найбільш подібною до нативної тканини. Колагенові волокна були більш ущільненими з практично відсутніми міжпучковими просторами. Місцями відзначалось зменшення звивистості волокон, що притаманна нативним тканинам, а на деяких ділянках, навпаки, амплітуда вигину волокон збільшувалася. Пучки нагадували товсті тяжі, між якими локально формувалися простори з тонкими фрагментованими волокнами.

В таблиці 3.5 наведені результати гістологічного аналізу зразків отриманого матриксу із перикарду ВРХ, що був децелюляризований за різними технологіями. Для встановлення статистичної достовірності дослідження аналіз проводився для 5 зразків в 5 полях зору для кожної технології, де наявність базофільно зафарбованих клітин вважалось позитивним результатом.

*Таблиця 3.5*

**Гістологічний аналіз виявлення клітин у зразках матриксу  
децелюляризованого за різними технологіями, метод фарбування  
гематоксилін-еозином**

Технології	Клітини, абс. (%)				Р
	Відсутність клітин у зразку	Поодинокі клітини у зразку	Невелика кількість клітин	Велика кількість клітин	
Контроль (нативний перикард ВРХ) (n=25)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	25 (100,0)	<0,001
Технологія 1 (n=25)	22 (88,0)	2 (8,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	
Технологія 1 (n=25)	21 (84,0)	4 (16,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Технологія 3 (n=25)	22 (88,0)	2 (8,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	
Технологія 4 (n=25)	23 (92,0)	2 (8,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Технологія 5 (n=25)	24 (96,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

Примітки: для порівняння між групами використано критерій хі-квадрат, постеріорні порівняння проводилися з урахуванням поправки Бонферроні.

При проведенні аналізу виявлено статистично значиму відмінність між групами за ступінню вираженості показника ( $p < 0,001$  за критерієм хі-квадрат). При цьому ступінь вираженості показника для зразків Контрольної групи (нативний перикард ВРХ) була статистично значимо ( $p < 0,05$ ) вища, ніж для зразків Технологій 1, 2, 3, 4 та 5. Статистично значимої відмінності показника між групами Технологія 1, Технологія 2, Технологія 3, Технологія



4, Технологія 5 не виявлено ( $p > 0,05$ ). Слід підкреслити, що якщо для Контрольної групи (нативний перикард ВРХ) «відсутність клітин» відмічена у 0% (95% ДІ 0,0% – 7,4%) зразків, Технологія 1 та Технологія 3 – у 88,0% (95% ДІ 71,8% – 97,8%) зразків, Технологія 2 – у 84,0% (95% ДІ 66,4% – 95,9%) зразків, Технологія 4 – у 92,0% (95% ДІ 77,6% – 99,4%) зразків, Технологія 5 – у 96,0% (95% ДІ 84,3% – 100%) зразків.

### **3.1.2.2. Використання методу фарбування DAPI для виявлення залишків ядерного матеріалу у зразках децелюляризованого матриксу**

4',6-діамідіно-2-феніліндол (DAPI) - синій флуоресцентний барвник для фарбування нуклеїнових кислот, який в комплексі з двохланцюговою ДНК дає в 20 разів сильнішу флуоресценцію. Плазматична мембрана практично непроникна для DAPI, тому він надзвичайно погано забарвлює живі клітини. Якщо ж мембрана пошкоджена, барвник проникає в клітину і зв'язується з ДНК. Таким чином, DAPI дозволяє забарвити нежиттєздатні клітини та оцінити їх кількість, в той час як живі клітини залишаються не забарвленими (негативними). При оцінці якості децелюляризації важливо не тільки відсутність живих клітин, а і їх компонентів (наприклад, НК), що можуть викликати імунологічну реакцію при імплантації матриксу.

При флуоресцентній мікроскопії спостерігали яскраве світіння барвника по всій поверхні препарату нативного перикарду ВРХ (рис. 3.4 А). Так як при препаруванні пошкоджується значна частина клітин, а генетичний матеріал зберігає свою структуру і залишається на матриксу.

Виявлення залишків ядерного матеріалу у зразках децелюляризованого матриксу проводили паралельно з гістологічним дослідженням. Так при фарбуванні зразків Технологій 1 та 2 за методом DAPI на 28 день децелюляризації було візуально зафіксовано не значне світіння барвника, що свідчить про наявність НК (рис. 3.4 В, С). В той же час морфологічно живих клітин у препаратах не спостерігалось. Це свідчить про те, що детергенти

гідроксид амонію в поєднанні з тритон X-100 та 1% SDS здатні зруйнувати живі клітини, але не позбавляють матрикс від антигенних біомолекул при дії протягом місяця.

Хоча у зразках Технології 3 вже на 14 день досліду не спостерігалось наявність живих клітин перикарду, однак при спектрофотометрії відзначається світіння ДНК (рис. 3.4 D). Можливо при збільшенні часу процесингу вдалося б досягти позитивного результату (повна відсутність світіння), однак значна зміна архітекtonіки матриксу стала причиною виключення даної Технології 3 з подальшого вивчення.

Найефективніше очищення тканини як від клітинних компонентів так і від ядерного матеріалу спостерігалось при застосуванні ферменту трипсину в поєднанні з 1% детергентом SDS Технології 4 та 0,1 % SDS Технології 5, про що свідчить попередні гістологічні дослідження та відсутність світіння DAPI на 14 та 21 день децелюляризації відповідно (рис. 3.4 E, F).

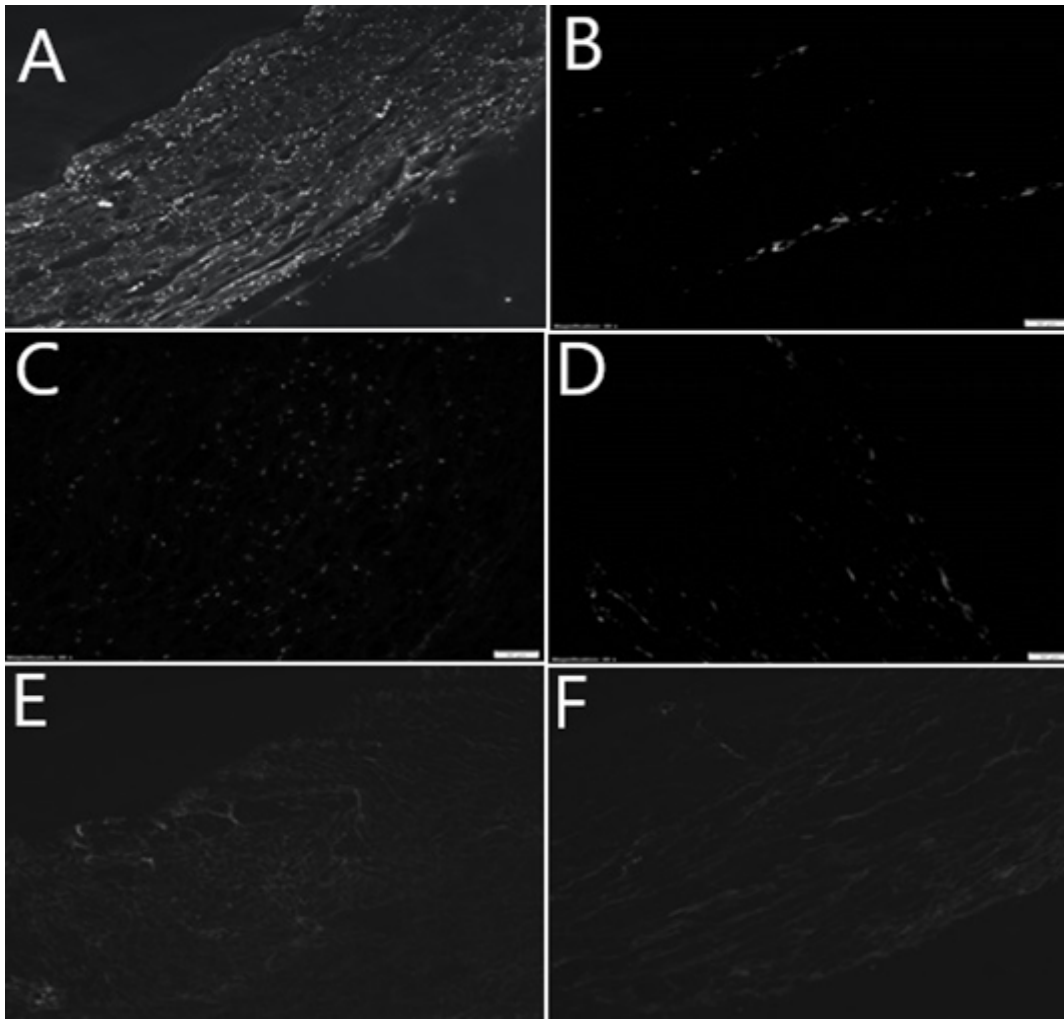


Рис. 3.4 Гістологічні зразки перикарду децелюляризованого за різними біотехнологічними протоколами (DAPI, люмінесцентна мікроскопія, x200). А - нативний перикард, інтенсивна флюоресценція по всьому зразку; В – поодинокі флюоресценції зразку Технології 1 (гідроксид амонію + Тритон Х-100); С – поодинокі флюоресценції зразку Технології 2 (1% SDS + гідроксид амонію + Тритон Х-100); D – поодинокі флюоресценції зразку технології 3 (1% SDS); E – відсутність флюоресценції в зразку Технології 4 (фермент Трипсин + 1% SDS); F – відсутність флюоресценції в зразку Технології 5 (0,1% SDS).

В таблиці 3.6 наведені результати аналізу флуоресцентної мікроскопії на виявлення нуклеїнових кислот у зразків отриманого матриксу із перикарду ВРХ, що був децелюляризований за різними технологіями. Для встановлення статистичної достовірності дослідження аналіз проводився для

5 зразків в 5 полях зору для кожної технології, де наявність яскраво вираженого світіння (флуоресценції) вважається позитивним результатом.

Таблиця 3.6

**Аналіз флуоресцентної мікроскопії на виявлення нуклеїнових кислот методом DAPI у зразках матриксу децелюляризованого за різними технологіями**

Технології	Флуоресценція, абс. (%)				p
	Відсутність світіння	Поодинокі світіння зразка	Помірне світіння зразка	Рівномірне світіння зразка	
Нативний (n=25)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	25 (100,0)	<0,001
Технологія 1 (n=25)	22 (88,0)	2 (8,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	
Технологія 2 (n=25)	21 (84,0)	4 (16,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Технологія 3 (n=25)	22 (88,0)	2 (8,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	
Технологія 4 (n=25)	23 (92,0)	2 (8,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Технологія 5 (n=25)	24 (96,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

Примітки: для порівняння між групами використано критерій хі-квадрат, постеріорні порівняння проводилися з урахуванням поправки Бонферроні.

При проведенні аналізу виявлено статистично значиму відмінність між групами за ступінню вираженості показника ( $p < 0,001$  за критерієм хі-квадрат). При цьому ступінь вираженості показника для зразків контрольної групи з нативним перикардом була статистично значимо ( $p < 0,05$ ) вища, ніж для зразків Технологій 1, 2, 3, 4, 5. Статистично значимої відмінності

показника між групами Технологія 1, Технологія 2, Технологія 3, Технологія 4, Технологія 5 не виявлено ( $p > 0,05$ ). Слід підкреслити, що якщо для Контрольної групи (нативний перикард ВРХ) «відсутність клітин» відмічена у 0% (95% ДІ 0,0% – 7,4%) зразків, Технологія 1 та Технологія 3 – у 88,0% (95% ДІ 71,8% – 97,8%) зразків, Технологія 2 – у 84,0% (95% ДІ 66,4% – 95,9%) зразків, Технологія 4 – у 92,0% (95% ДІ 77,6% – 99,4%) зразків, Технологія 5 – у 96,0% (95% ДІ 84,3% – 100%) зразків.

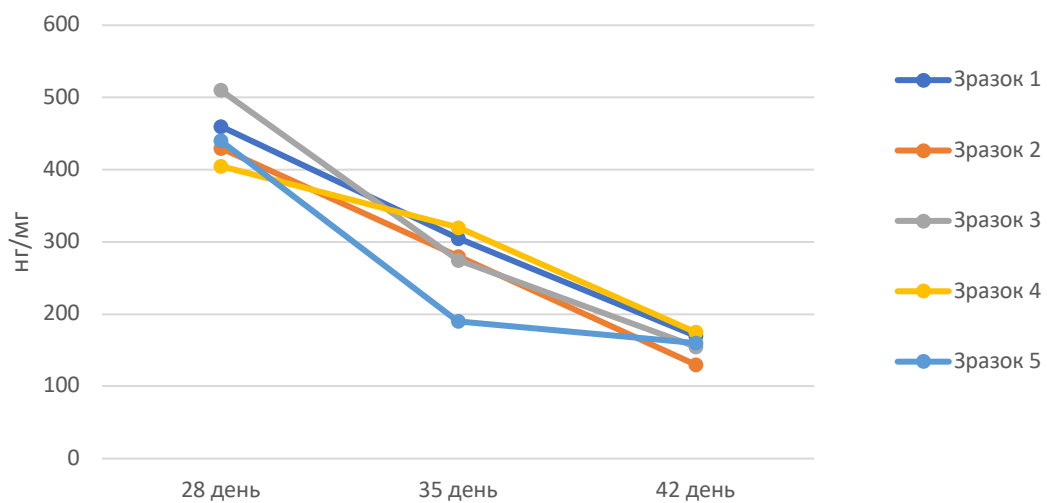
### **3.1.2.3. Визначення концентрації нуклеїнових кислот у зразках децелюляризованого матриксу методом спектрофлуометрії**

Відомо, що клітинні складові в тому числі і нуклеїнові кислоти ксеногенних тканин є сильними антигенами, які запускають імунологічні реакції в організмі реципієнта, що провокує відторгнення трансплантата. Ефективним вважається такий протокол децелюляризації, за використання якого відбувається повне видалення всіх компонентів клітини та нуклеїнових залишків [71].

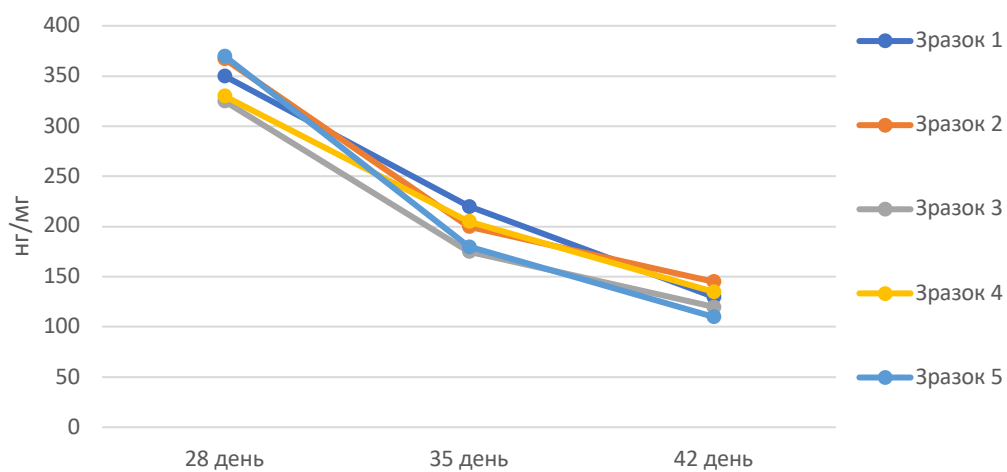
В даному дослідженні було проведено кількісне спектрофлуометричне визначення концентрації ДНК *нг/мг* в сухому залишку тканини. Також варто зазначити, що для зразків Технології 3, які в процесі децелюляризації 1% SDS при  $t\ 24^{\circ}\text{C}$  втратили свої біомеханічні властивості, детекція нуклеїнової кислоти не проводилася. Дані зразки були виключені з подальших досліджень за низької ефективності застосованого методу очистки і пошкодження структури архітектоніки матриксу.

У всіх тестових групах було відзначено зменшення концентрації ДНК в ДПМ при збільшенні часу процесингу (Рис. 3.5). Однак, для Технології 1 було зафіксовано концентрацію на рівні  $158 \pm 18$  нг/мг навіть на 42 день спостереження. Отриманні дані свідчать про низький ступінь очистки тканини такими детергентами як гідроксид амонію та тритон X-100, що виключає дану групу з подальших тестувань.

## Технологія 1 – Гідроксид амонію + Тритон X-100



## Технологія 2 – 1% Додецилсульфат натрію + Гідроксид амонію + Тритон X-100



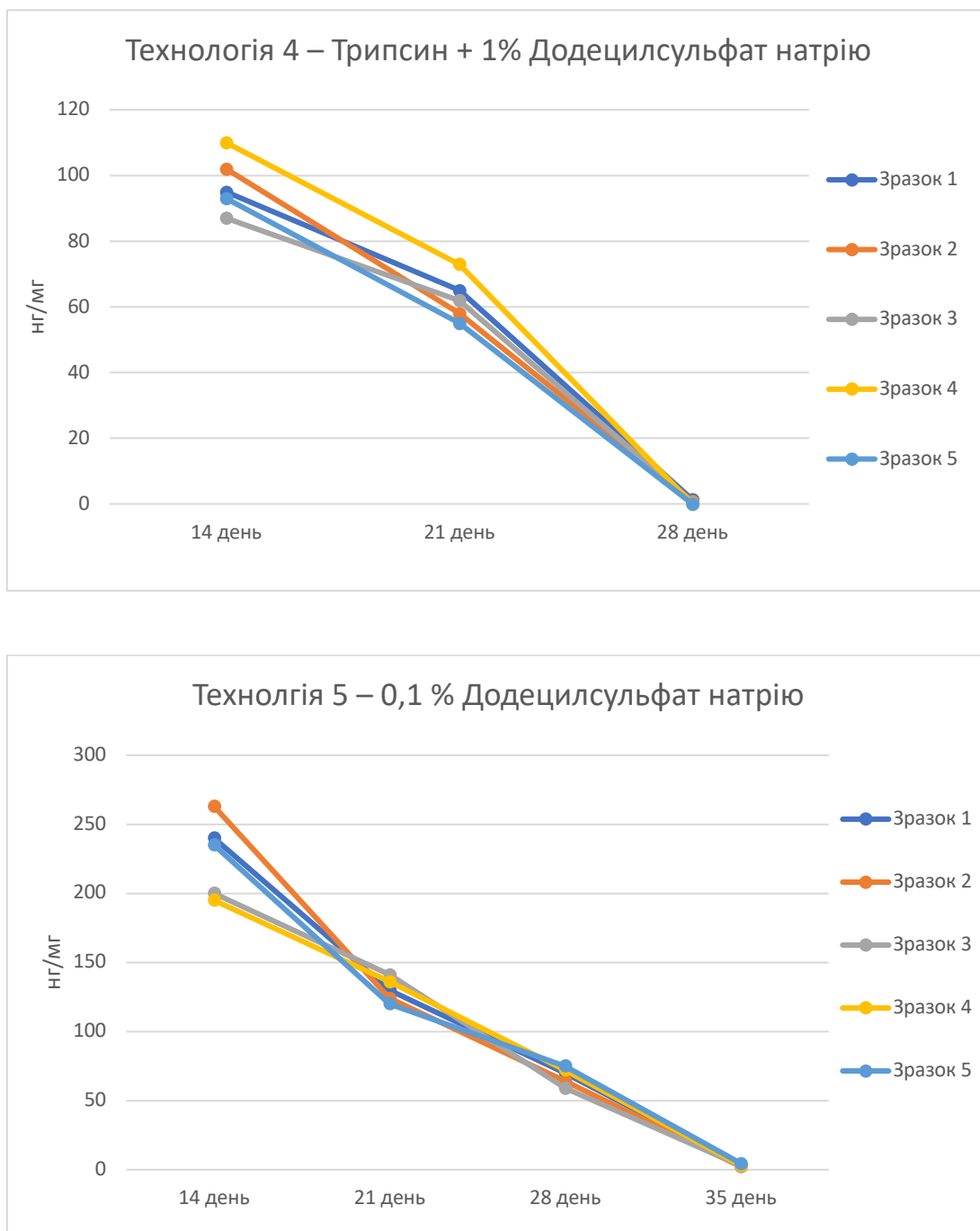


Рис. 3.5 Спектрофлуометричне визначення концентрації ДНК нг/мг в сухому залишку децелюляризованої тканини перикарда ВРХ

Такий же ефект спостерігався і для зразків Технології 2, де на 42 день дослідження концентрація ДНК становила  $128 \pm 14$  нг/мг. Такі результати вимагали продовження процесингу матеріалу і свідчили про низьку ступінь комплексної очистки неіонними детергентами гідроксид амонію і тритон X-

100 та 1 % іонним миючим засобом SDS. На противагу даним нашого дослідження, Robert Ramm et.al продемонстрували високу ефективність очистки від нуклеїнових кислот при одночасному використанні трипсину та Тритон X-100 [135]. В той же час науковцями було визначено суттєві відмінності між протоколами, де децелюляризація клінічно затвердженим протоколом із застосуванням додецилсульфат натрію та дезоксихолат натрію (SD) не призвела до видалення ДНК.

Концентрацію ДНК нижче 5 нг/мг було зафіксовано на 28 день експерименту для зразків Технології 4 (рис. 3.5). А для зразків Технології 5 майже така ж кількість нуклеїнової кислоти була визначена вже на 35 день. Такі результати показують високу ступінь очистки ДПМ від біомолекул із застосуванням іонного детергента SDS. Однак для повноцінної оцінки даних протоколів слід визначити ступінь цитотоксичності використовуваних матеріалів, адже SDS має властивість не вимиватися і затримуватись в позаклітинному матриксу, що призводить до руйнування клітин донора.

*Таблиця 3.5*

**Вміст ДНК (нг/мг) в нативних і децелюляризованих тканинах перикарду  
ВРХ, М±SD**

Показник	Нативний перикард (n=5)	Технологія 1 (n=5)	Технологія 2 (n=5)	Технологія 4 (n=5)	Технологія 5 (n=5)
Вміст ДНК (нг/мг)	1436±155 <sup>1245</sup>	158±18* <sup>45</sup>	128±14*	0,54±0,57* <sup>2</sup>	3,22±0,87* <sup>2</sup>

Примітки: для порівняння між групами використано дисперсійний аналіз, постеріорні порівняння проводилися за критерієм Шеффе

\* – відмінність від показника нативного перикарду ВРХ статистично значима,  $p < 0,05$ ;

<sup>1</sup> – відмінність від показника для групи технологія 1 статистично значима,  $p < 0,05$ ;

<sup>2</sup> – відмінність від показника для групи технологія 2 статистично значима,  $p < 0,05$ ;

<sup>4</sup> – відмінність від показника для групи технологія 4 статистично значима,  $p < 0,05$ ;

<sup>5</sup> – відмінність від показника для групи технологія 5 статистично значима,  $p < 0,05$ .



Таким чином, кількісний аналіз на виявлення нуклеїнових кислот у ДПМ показав, що в процесі децеллюляризації перикарду ВРХ було видалено близько 90% ДНК за використанням протоколу Технології 1 та 91 % ДНК для Технології 2 (табл. 3.5), що є недостатнім для використання таких тканин у ксенотрансплантації. В той же час пртоколи Технології 4 та 5 забезпечили 99% видалення ДНК із нативного перикарду, що свідчить про високий ступінь очистки матриксу від антигенних молекул, що в подальшому забезпечить зменшення ймовірності відторгнення тканини при імплантації.

### Резюме

В ході дослідження проведено синтез 5 оригінальних модифікацій протоколу виготовлення біоімпланту. Результати гістологічного та молекулярно-генетичного аналізів підтвердили ефективність застосовуваних технологій для повного видалення клітин та їх компонентів зі збереженням архітектоніки, просторової орієнтації і структурної цілісності сполучнотканинного компоненту тканини з найбільшою відповідністю до структури нативного перикарду ВРХ.

## РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ БЕЗПЕЧНОСТІ БІОІМПЛАНТУ

Головною метою тканинної інженерії є створення *in vitro* таких тканинних компонентів, імплантація яких в організмі реципієнта призводить до регенерації пошкоджених або нефункціональних тканин та органів за рахунок контролю стимуляції клітин-мішеней, що опосередкована механізмами сигналінгу та механотрансдукції. Передбачається, що організм сам себе виліковує за рахунок доставки в необхідну ділянку молекулярних сигналів, клітин і/або підтримуючих конструкцій. Засобами доставки цих клітин являються скафолди, які, у свою чергу, можуть служити в якості матриці на якій відбувається трансформація клітин в необхідну тканину з формуванням визначеної конструкції [97]. У такій ситуації біосумісність матриць для тканинної інженерії визначається її здатністю виконувати функції субстрату, що підтримує певну клітинну активність. Зокрема, біоматеріал повинен полегшити передачу молекулярних та механічних сигналів з метою оптимізації тканинної регенерації, не викликаючи небажаних місцевих або системних ефектів [36, 71, 126, 144]. При оцінці біосумісності отриманого скафолду необхідно враховувати не тільки його склад, біологічні властивості, а і цитотоксичний ефект матеріалу на клітини реципієнта, здатність активувати лімфоцити, запускаючи при цьому небажану імунологічну реакцію і як наслідок відторгнення біоімпланту.

### 4.1. Вивчення цитотоксичних та інтегративних властивостей децелюляризованого матриксу *in vitro*

За даними попередніх тестувань було визначено 2 технологічні схеми децелюляризації, що дозволяють виділити екстрацелюлярний позаклітинний матрикс з високими показниками очистки від клітин і нуклеїнових кислот, та мали високий біомеханічний коефіцієнт. Цитотоксичні властивості були визначені для децелюляризованого матриксу Технології 4 (трипсин + 1% SDS) та Технології 5 (0,1% SDS). Для визначення цитотоксичності проводили

культивування зразків матриксу в суспензії фібробластів людини. Для цього використовували культуру клітин іморталізованої лінії фібробластів, трансфєкованих флуоресцентним білком мітохондріальної локалізації. Скринінг росту клітин проводили щотижнево використовуючи люмінесцентну мікроскопію.

Після першого тижня культивування проводився контроль наявності живих клітин за допомогою флуоресцентного мікроскопу. Через два тижні культивування зразки повторно досліджували, порівнюючи кількість та розташування клітин на скафолді (рис. 4.1). При мікроскопічному дослідженні на зразках Технології 4 (трипсин + 1% SDS) клітини чітко помітні, укрупнені, веретено видної форми, з крупними ядрами, розташовані протяжними групами, імовірно, орієнтовані за розташуванням волокон скафолду. В свою чергу при дослідженні зразків Технології 5 (0,1% SDS) також спостерігали позитивну динаміку росту клітин, фібробласти чітко помітні, веретено видної форми, дрібні з помітними ядрами, розташовані протяжними групами, імовірно, також орієнтовані за розташуванням волокон скафолду. Таким чином, при не довготривалому культивуванні не спостерігається цитотоксичного ефекту. Примітно, що децелюляризація свинячого перикарду з концентраціями 0,1 %, 0,3 % та 0,5 % SDS також не показала цитотоксичного впливу на фібробласти людини при спостереженні протягом 24 год [17].

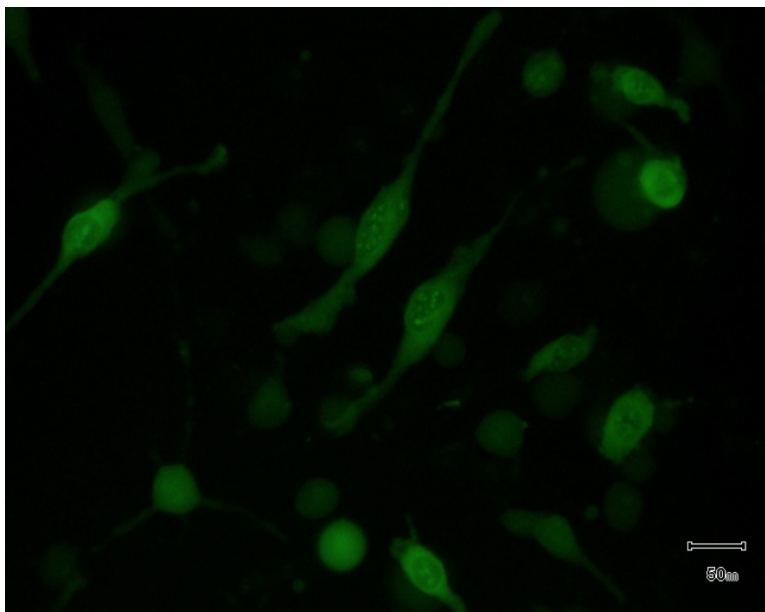
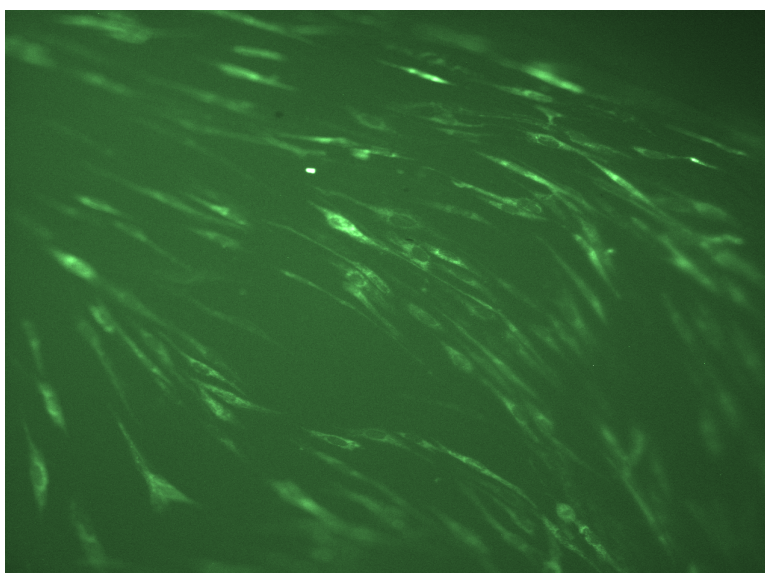
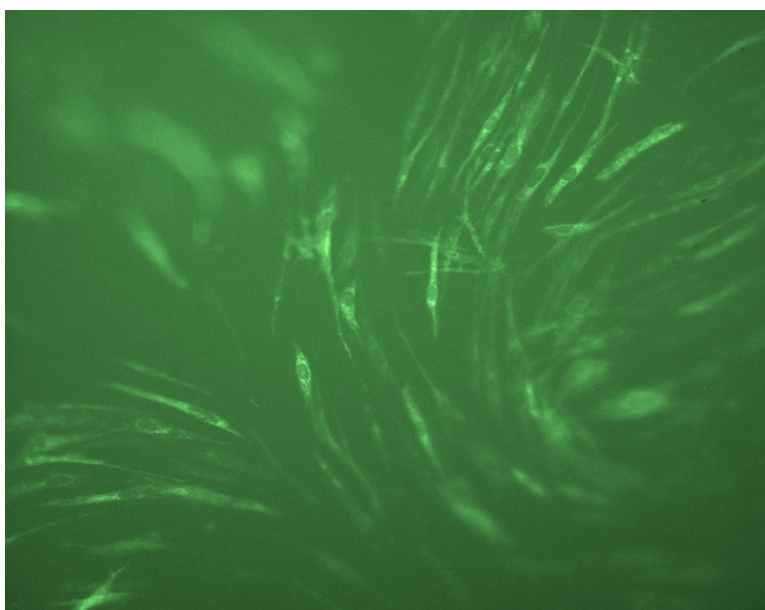
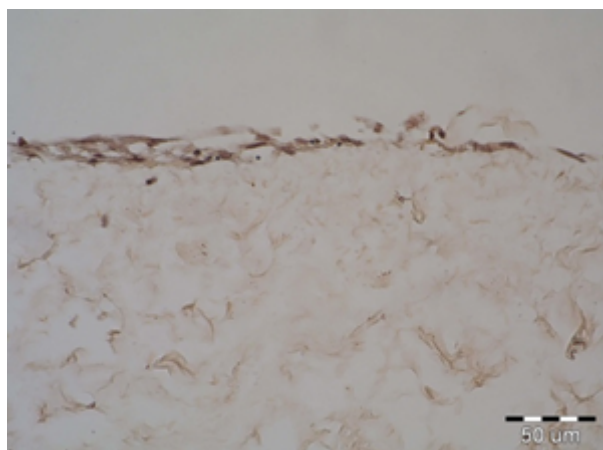
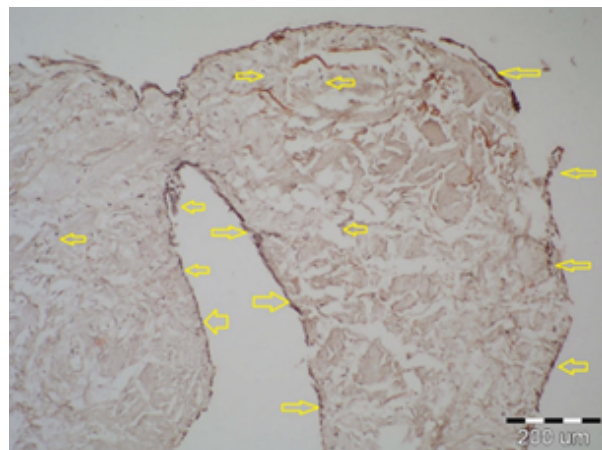
**A****B****C**

Рис. 4.1. Наявність живих клітин та їх розташування на скафолді через 2 тижні культивування (флуорисцентна мікроскопія,  $\times 200$ ). А – іморталізована лінія фібробластів (контроль); В – флуоресценція фібробластів на ДПМ перикарду ВРХ Технології 4 (трипсин + 1% SDS); С – флуоресценція фібробластів на ДПМ перикарду ВРХ Технології 5 (0,1% SDS).

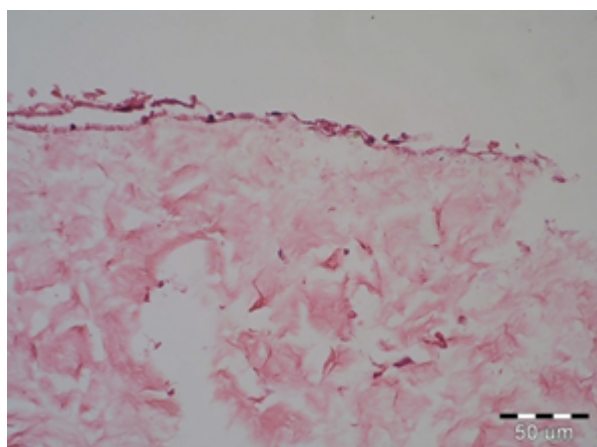
Подальше вивчення цитотоксичності ДПМ передбачало гістологічне дослідження зразків через один та два місяці культивування. Результати мікроскопії дозволили отримати об'єктивне уявлення про ступінь цитотоксичності матеріалу, розташування заселених клітин у скафолдах, а також стан сполучнотканинних волокон в зразках. Так, за даними мікроскопії через місяць культивування в досліджуваних зразків обох технологій спостерігали незначне збільшення кількості клітин, які чітко помітні, веретено видної форми, дрібні з помітними ядрами, розташовані протяжними групами, імовірно, орієнтовані за розташуванням волокон скафолду (рис. 4.2 та 4.3). В диспергованих поверхневих волокнах фібробласти часто згуртовані у кластери. Клітини у скупченнях з високою щільністю мають укрупнені ядра, та більш округлу форму. Окремі групи та поодинокі фібробласти проникли в товщу скафолду на глибину до 150 мкм, зазвичай у ділянках меншої щільності колагенових масивів. В основному тканини позбавлені клітинних елементів. Структура колагенових та еластинових волокон не змінена.



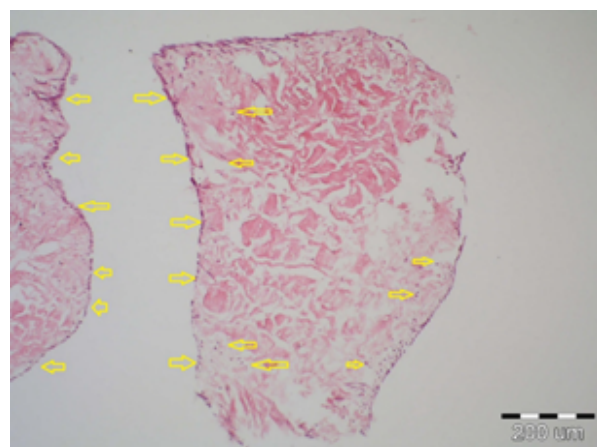
A



B



C



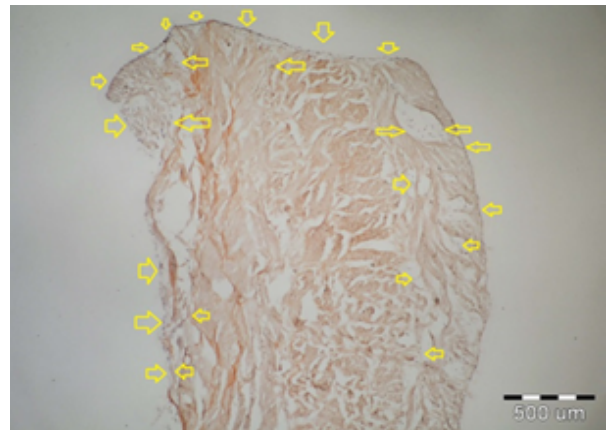
D

Рис. 4.2 Гістологічне дослідження ДПМ перикарду ВРХ Технології 4 (трипсин + 1% SDS) після 1 місяця культивування фібробластів людини (світлова мікроскопія). А –структура колагенових та еластинових волокон незмінена (фарбування Конго,  $\times 50$ ); В – стрілками вказані живі клітини на матриксі (фарбування Конго,  $\times 200$ ); С –структура колагенових та еластинових волокон незмінена (фарбування гематоксилін/еозин,  $\times 50$ ); D – стрілками вказані живі клітини на матриксі (гематоксилін/еозин,  $\times 200$ ).

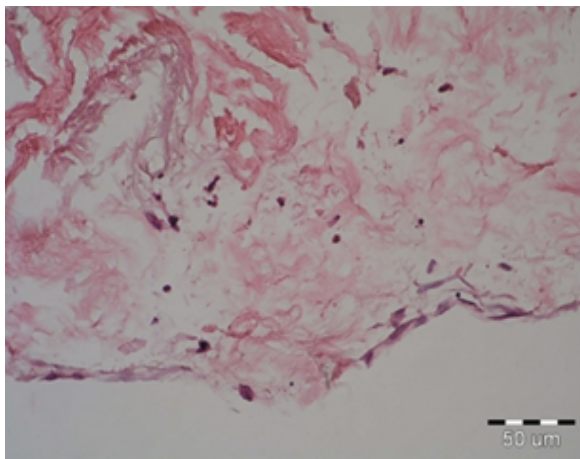




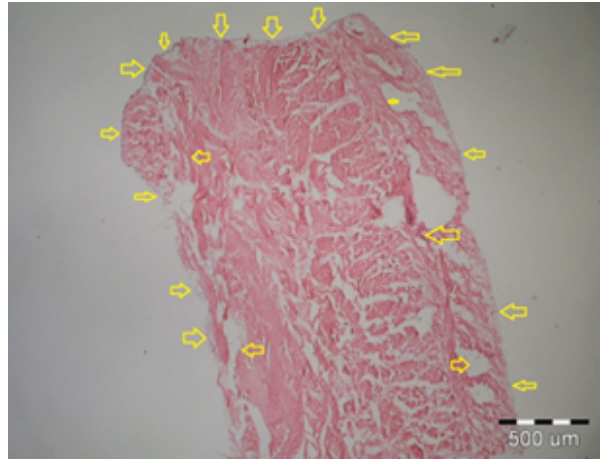
A



B



C



D

Рис. 4.3 Гістологічне дослідження ДПМ перикарду ВРХ Технології 5 (0,1% SDS) після 1 місяця культивування фібробластів людини (світлова мікроскопія). А –структура колагенових та еластинових волокон незмінена (фарбування Конго,  $\times 50$ ); В – стрілками вказані живі клітини на матриксі (фарбування Конго,  $\times 500$ ); С –структура колагенових та еластинових волокон незмінена (фарбування гематоксилін/еозин,  $\times 50$ ); D – стрілками вказані живі клітини на матриксі (гематоксилін/еозин,  $\times 500$ ).

В таблиці 4.1 наведені результати аналізу цитотоксичного ефекту для зразків децелюляризованого матриксу за Технологією 4 та Технологією 5. Аналіз проводився для 5 зразків в 5 полях зору для кожної з технологій, в

результаті якого визначали ступінь цитотоксичності після 1 місяця експерименту.

*Таблиця 4.1*

**Результати цитотоксичного аналізу після 1 місяця спостереження**

Технології	Цитоксичний ефект через 1 місяць, абс. (%)			Р
	Не цитотоксичний	Легка цитотоксичність	Середня цитотоксичність	
Технологія 4 (n=25)	24 (96,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	>0,99
Технологія 5 (n=25)	24 (96,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	

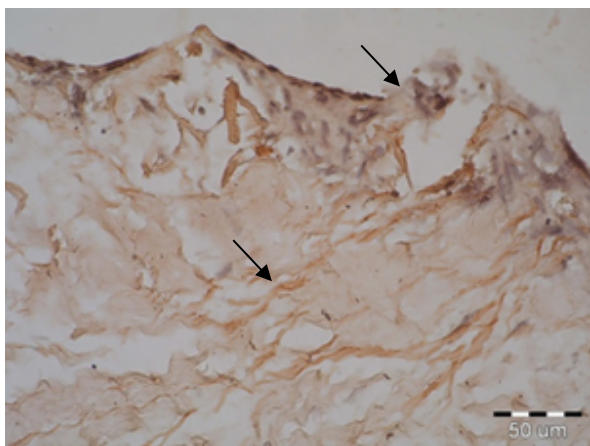
Примітки: для порівняння між групами використано критерій хі-квадрат.

При проведенні аналізу не виявлено статистично значимої відмінності між групами за ступінню цитотоксичності на 1 місяць ( $p > 0,99$  за критерієм хі-квадрат). Що свідчить, про відсутність деструктивного впливу додецилсульфат натрію різної концентрації на клітини фібробластів людини при недовготривалому спостереженні.

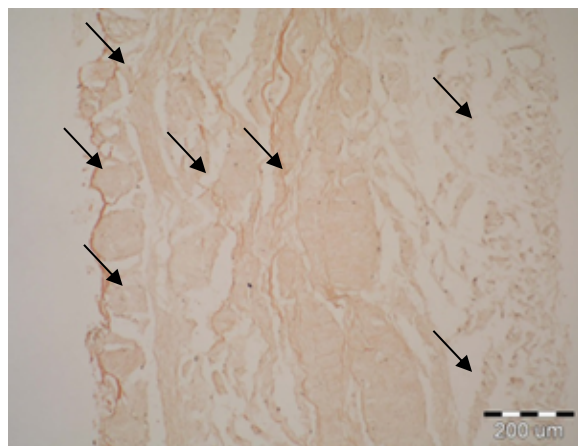
Оцінка росту фібробластів через два місяці культивування показала значне зменшення росту клітин на поверхні досліджуваних фрагментів тканини Технології 4. На зразках даної групи клітини мали нормальну морфологію, місцями на поверхні фіксувались агрегати фібробластів. Ступінь загибелі клітин носив вогнещевий характер. Відзначено структурні зміни колагенових та еластинових волокон. Переважна кількість клітин роозташовувалась у товщі тканини, поодинокі фібробласти фіксувались на значній глибині (рис. 4.4). Rieder E. та інші, при спостереженні за децелюляризованою тканиною свинячого клапана серця за допомогою трипсину та детергенту SDS, відмітили велику кількість загиблих клітин на



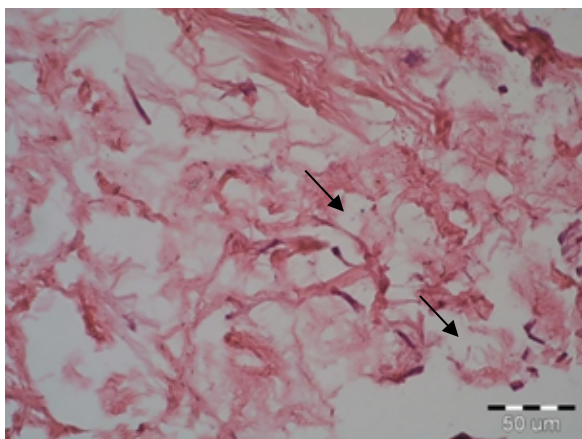
поверхні скафолду, що було проявом цитотоксичного впливу отриманої тканини [18].



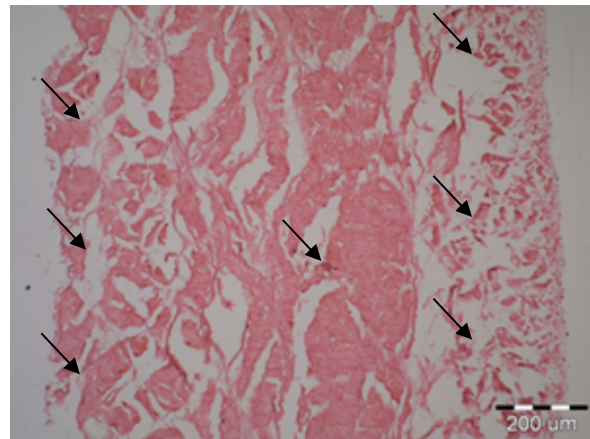
**A**



**B**



**C**



**D**

Рис. 4.4 Гістологічне дослідження ДПМ перикарду ВРХ Технології 4 (трипсин + 1% SDS) після 2-х місяців культивування фібробластів людини (світлова мікроскопія). А – структура колагенових пучків змінена, зменшення кута завитків та збільшення простору між волокон (фарбування Конго,  $\times 50$ ); В – зменшення кількості живих клітини на матриксі (фарбування Конго,  $\times 200$ ); С – структура колагенових пучків змінена, зменшення кута завитків та збільшення простору між волокон (фарбування гематоксилін/еозин,  $\times 50$ ); D – зменшення кількості живих клітини на матриксі (гематоксилін/еозин,  $\times 200$ ).

В той же час, в Технології 5 після двох місяців культивування колагенові та еластинові компоненти матриксу гарно виражені, пучки волокон потужні, впорядковані. Переважна більшість клітин розміщується рівномірним шаром на поверхні зразку. Окремі групи фібробластів проникли на значну глибину, але лише у місцях де пучки волокон менш щільні (рис. 4.5). Кількість клітин у зразках даної групи стала вищою ніж при оцінці попередньої мікроскопії. Глибоке проникнення та локалізація клітин асоційовані з місцями зменшення щільності пучків. Спостерігалось проникнення груп клітин фібробластів на глибину до 250 мкм. Поодинокі фібробласти фіксувались на глибині до 350 мкм від поверхні зразку. Клітини нормальної морфології, дрібні, веретеноподібні, витягнуті, ростуть у високій щільності, асоційовані з колагеновими та еластиновими волокнами, чітко упорядковані, розподілені по поверхні та у ділянках концентрації рівномірно без агрегатів. Таким чином, ми відмітили повноцінний ріст клітин на підготовлених скафолдах Технології 5 і не зафіксували загибелі фібробластів протягом двох місяців культивування. Китайські вчені прийшли до висновку, що детергенти можуть спричинювати зміну мікроархітектури поверхні ДПМ, що в свою чергу може негативно вплинути на проліферацію фібробластів міокарда. У своїх дослідженнях вони показали, що мікроструктура децелюляризованої свинячої тканини серця відрізняється залежно від агентів децелюляризації. Порівняно з трипсином та Triton X-100, SDS не тільки ефективніше децелюляризувався, але й зберігав біосумісну мікроструктуру ДПМ для рецелюляризації [22].

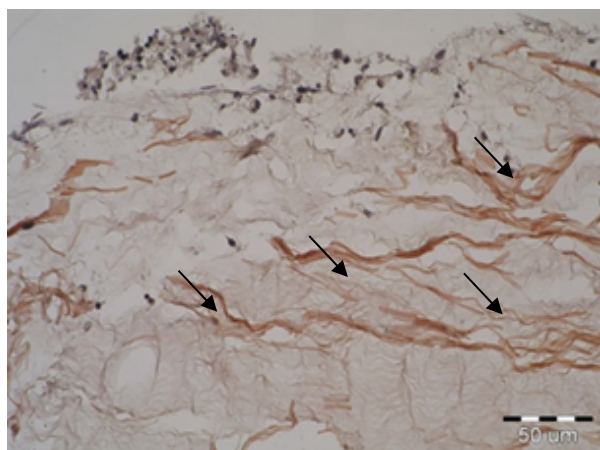
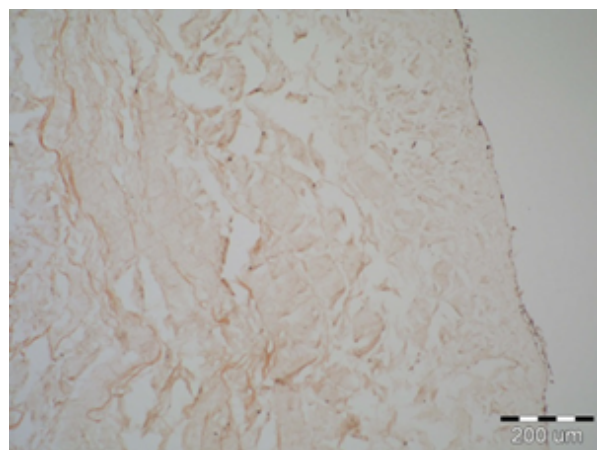
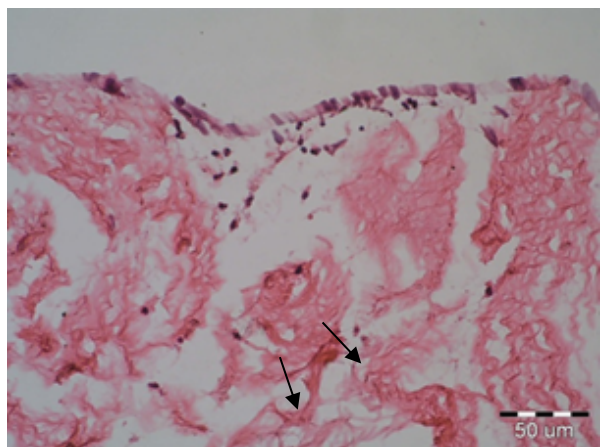
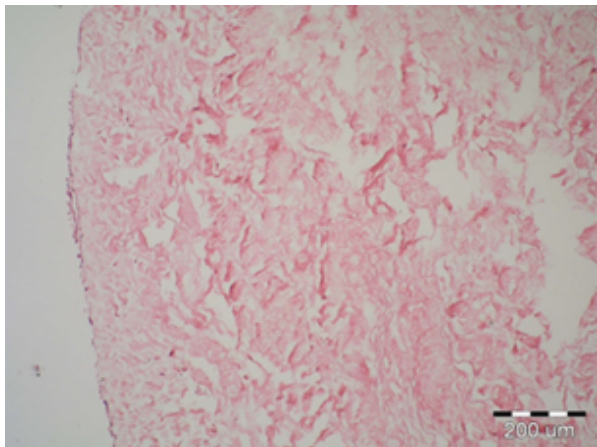
**A****B****C****D**

Рис. 4.5 Гістологічне дослідження ДПМ перикарду ВРХ Технології 5 (0,1% SDS) після 2-х місяців культивування фібробластів людини (світлова мікроскопія). А – колагенові та еластинові компоненти матриксу гарно виражені, пучки волокон потужні, впорядковані (фарбування Конго,  $\times 50$ ); В – збільшення кількості живих клітин (фарбування Конго,  $\times 200$ ); С – колагенові та еластинові компоненти матриксу гарно виражені, пучки волокон потужні, впорядковані (фарбування гематоксилін/еозин,  $\times 50$ ); D – збільшення кількості живих клітин (гематоксилін/еозин,  $\times 200$ ).

В таблиці 4.2 наведені результати аналізу цитотоксичного ефекту для зразків децелюляризованого матриксу за Технологією 4 та Технологією 5. Аналіз проводився для 5 зразків в 5 полях зору для кожної з технологій, в

результаті якого визначали ступінь цитотоксичності після 2 місяців експерименту.

Таблиця 4.2

**Результати цитотоксичного аналізу після 2 місяців спостереження**

Технології	Цитотоксичний ефект через 2 місяці, абс. (%)			p
	Не цитотоксичний	Легка цитотоксичність	Середня цитотоксичність	
Технологія 4 (n=25)	16 (64,0)	6 (24,0)	3 (12,0)	0,04
Технологія 5 (n=25)	23 (92,0)	2 (8,0)	0 (0,0)	

Примітки: для порівняння між групами використано критерій хі-квадрат.

При проведенні аналізу виявлено статистично значиму відмінність між групами за ступінню цитотоксичності на 2 місяць ( $p=0,04$  за критерієм хі-квадрат). При цьому ступінь вираженості цитотоксичності для зразків Технології 4 була статистично значимо ( $p < 0,05$ ) вища, ніж для зразків Технології 5. Так якщо для Технології 4 «відсутність токсичності» відмічена лише у 64,0% (95% ДІ 43,6% – 82,1%) зразків, то для Технології 5 – у 92,0% (95% ДІ 77,6% – 99,4%) зразків. Результати даного аналізу свідчать про цитотоксичний вплив при довготривалому спостереженні 1% розчину додецилсульфату натрію, що є основним компонентом Технології 4. Зниження концентрації даного реагенту в 10 разів (Технологія 5) статистично підтверджує відсутність деструктивного впливу на клітини людини.

Оскільки децелюляризація забезпечує видалення всіх клітинних компонентів з тканини, одночасно зберігаючи мікро- та макроанатомію позаклітинного матриксу [71], то відповідним наступним етапом було проведення дослідження спрямоване на визначення біологічних властивостей матриксу. Відсутність токсичного впливу ДПМ на клітини донора є

важливою частиною відбору для подальшої трансплантації. Було висловлено гіпотезу, що децелюляризований перикард ВРХ за допомогою іонного детергенту содіум додецил сульфату, не спричинить жодного цитотоксичного ефекту на клітини людини. Результати висвітленні вище підтверджують цю гіпотезу. У нашому дослідженні ми не спостерігали жодного цитотоксичного ефекту *in vitro* для матрикса Технології 5, децелюляризованого з низькою концентрацією 0,1% SDS. Ріст клітин оцінювали протягом 2 місяців. Хоча більшість експериментів вивчали подібний вплив на клітини протягом короткого періоду часу (від 24 до 48 годин), але довготривалі дослідження є більш ефективними для наступного етапу трансплантації [74, 93, 151]. Однак існували значні розбіжності при оцінці цитотоксичного впливу, особливо в Технології 4, де застосовували в 10 разів вищу концентрацію SDS та додатково очищали ферментом трипсином. У зразках спостерігалось вогнищеве руйнування фібробластів в умовах тривалого культивування до 2-х місяців. На окремих ділянках клітини формували аномальні морфологічні агрегати. Це можна пояснити ймовірними процесами ресинтезу волокон. Також відзначено структурні зміни в колагенових та еластинових волокнах. Відомо, що SDS є іонним миючим засобом, здатним зв'язувати колагенові волокна, таким чином руйнуючи їх та сприяючи набряку тканини, викликаному потенційним розривом водневих зв'язків колагенових волокон [71, 126]. Також встановлено, що SDS дуже сильно взаємодіє з білками ДПМ, що робить їх повне видалення досить складним [40]. Беручи до уваги цей факт, можна припустити, що ми використовували дуже високу концентрацію SDS у Технологічній схемі 4, що призвело до негативних змін в архітектоніці матриці і прояву цитотоксичного впливу на культуру клітин.

#### 4.2. Дослідження біосумісності децелюляризованого матриксу в умовах *in vivo*

Головною метою даного дослідження було, використовуючи сучасні підходи тканинної інженерії, зробити ксенотканину придатною для трансплантації. Оскільки процес децелюляризації забезпечує створення біоматеріалу механічно стійкого, функціонально надійного, неімунногенного та здатного підтримувати опосередкований клітинний ріст, то наступним етапом дослідження було випробування ксенотканини на біосумісність із живими організмами. Таким чином, ідеальний трансплантат повинен бути вільним від будь-яких клітин, мати достатню стійкість і бути здатним довго витримувати механічні навантаження, при цьому зберігати структуру позаклітинного матриксу [71]. Однією з найважливіших вимог до безпеки скафолду є визначення біосумісних властивостей біоматеріалу [36, 126]. Тому було порівняно дві технології отримання ДПМ перикарду ВРХ щодо біосумісних особливостей в умовах *in vivo*, а саме Технологію 4 – трипсин + 1% SDS та Технологію 5 – 0,1% SDS.

Гістологічний аналіз встановив, що при фарбуванні гематоксиліном-еозином у децелюляризованих за обома технологіями тканинах перикарда не було видимих клітинних ядер у порівнянні із нативним перикардом (Рис. 4.6). Також не встановлено очевидної різниці у структурі, включаючи розподіл колагенових та еластинових волокон, між природним та децелюляризованим перикардом ВРХ в обох технологіях.



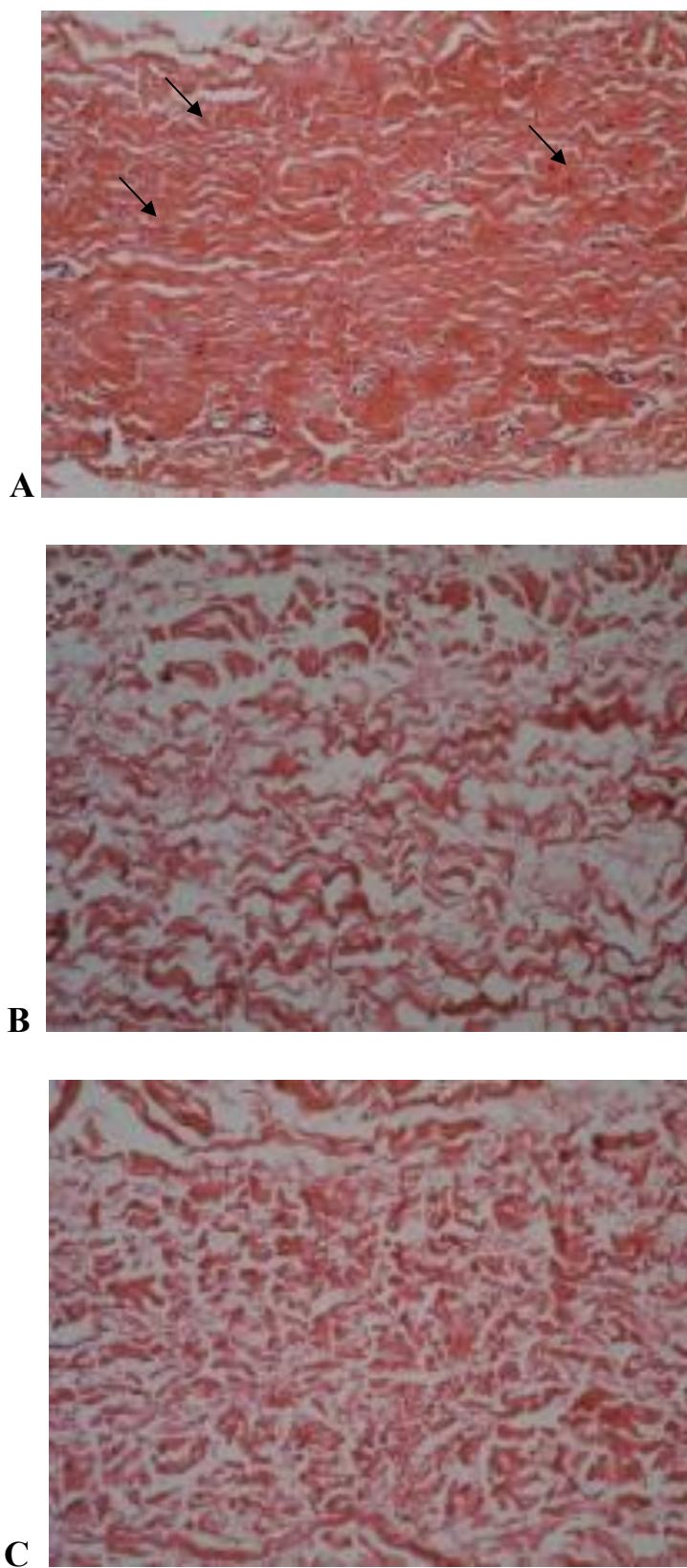


Рис. 4.6. Мікрофотографії гістологічних зрізів децелюляризованого та нативного перикарду ВРХ. Пофарбований, що демонструє відсутність видимих ядер клітин у децелюляризованому бичачому перикарді Технологій

4 та 5 (фарбування гематоксиліном / еозином, світлова мікроскопія x200). А – наявність базofilно зафарбованих клітин, нативний перикард; В - відсутність видимих зафарбованих базofilно клітин у ДПМ Технології 4 (фермент трипсин + 1% SDS); С - відсутність видимих зафарбованих базofilно клітин у ДПМ Технології 5 (0,1% SDS)

Мікроскопічне дослідження підтвердило, що колагеновий та еластичний компоненти позаклітинного матриксу збережені в повній мірі (рис. 4.7). У зрізах ДПМ Технології 4 розподіл колагенових волокон виявився менш щільним, ніж у Технології 5.







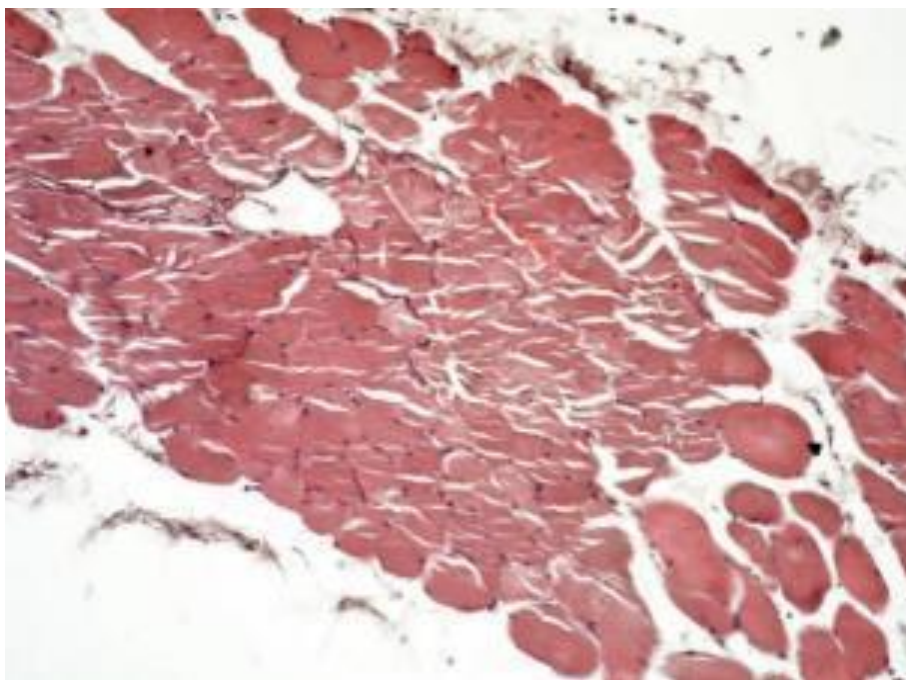
Рис. 4.7. Мікрофотографії гістологічних зрізів децелюляризованого перикарда ВРХ (фарбування Конго x200) А – структура колагенових волокон, нативний перикард; В – структура колагену з невеликими просторами між волокнами ДПМ Технології 4 (трипсин + 1% SDS); С – структура колагену ДПМ Технології 5 (0,1% SDS)

Вивчення біосумісності проводили шляхом імплантації досліджуваних зразків ДПМ Технологій 4 та 5 щурам лінії Вістар в ділянку міжлопаткового простору. В якості контролю використовували нативну тканину перикарду ВРХ. Протягом експерименту всі тварини вижили та були активні, спрага і апетит зберігалися. Неврологічних розладів не спостерігалось. Через 3 місяці тварин виводили з експерименту, після чого вилучали комплекс тканин лопаточної ділянки щурів (разом із імплантованою структурою) та досліджували мікроскопічно.

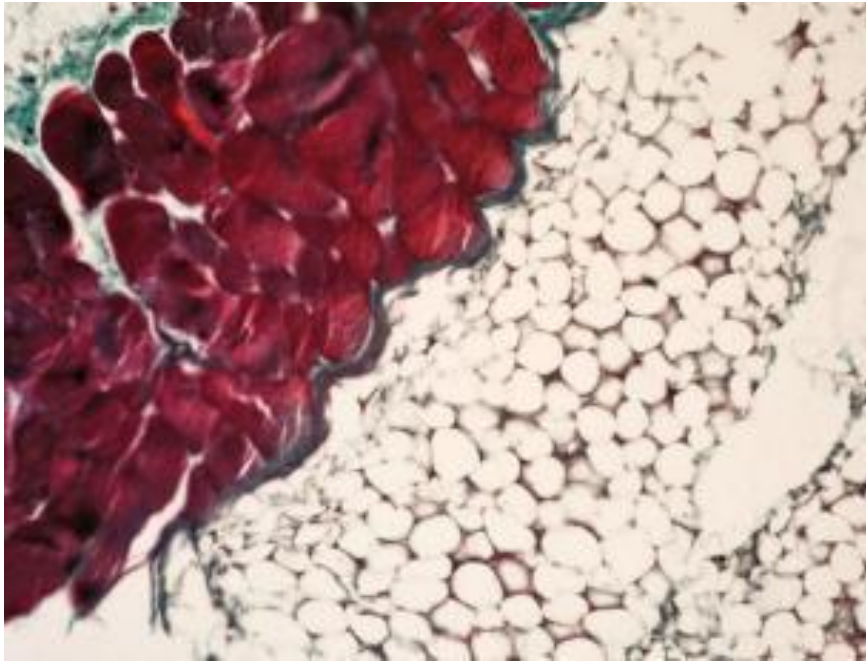
Кінцевою метою імплантації є інтеграція біоімпланту в тканину хазяїна, із подальшою її регенерацією [134]. На рис. 4.8 представлено гістологічне дослідження експлантованого перикарду у щурів контрольної групи, яким було імплантовано необроблений/нативний бичачий перикард. Як і слід було очікувати, перикард повністю деградований і елімінований, спостерігається лише сполучна та м'язова тканина оперованої досліджуваної

тварини. Тканина інфільтрована лейкоцитами, що свідчить про запальні процеси в даній ділянці.

У тварин Технології 4, де імплантовано перикард оброблений ферментом трипсином та 1% іонним детергентом SDS, в поперечно-смугастих м'язах прилеглих до імплантату відзначений набряк м'язових волокон і незначна лімфоцитарна інфільтрація, що свідчить про розвиток запалення. Чітко видно ділянку імплантату, що руйнується. У поперечно-м'язовій тканини спостерігається набряк м'язових волокон та стаз, що свідчить про зупинку або вповільнення току крові в судинах мікроциркуляторного русла (головним чином у капілярах).



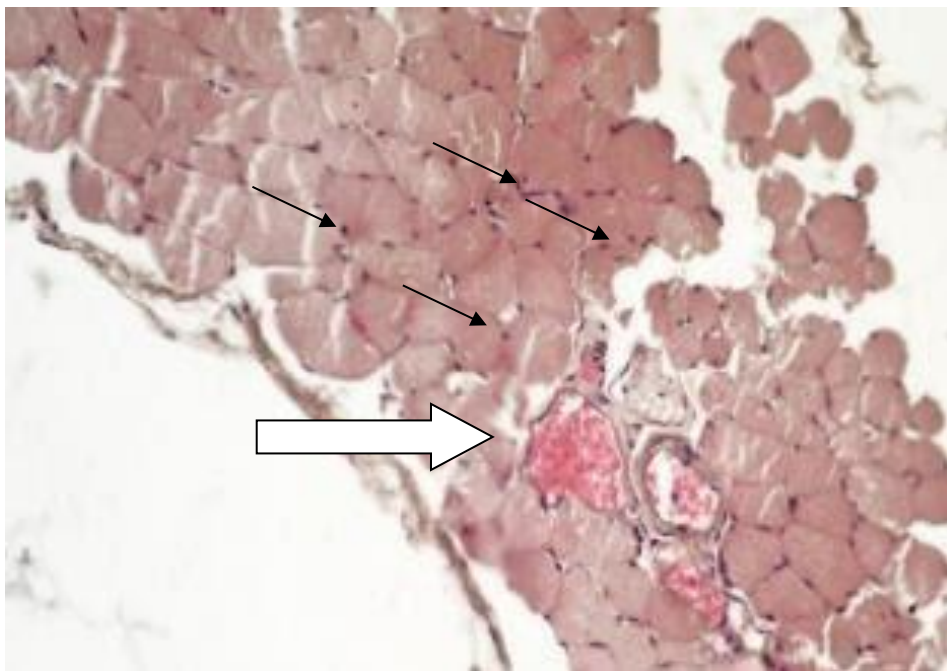
**A**



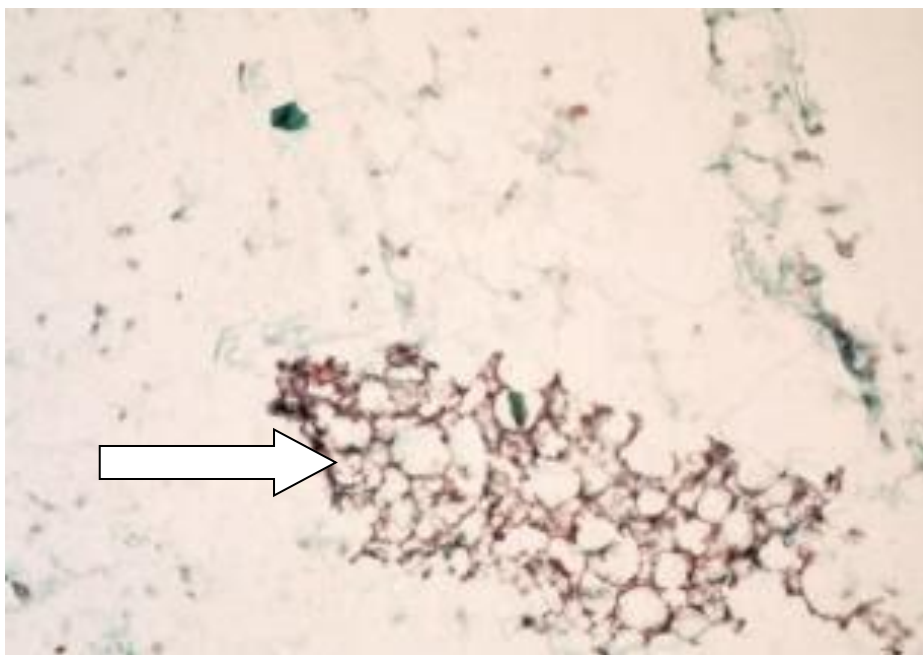
**В**

Рис. 4.8. Мікрофотографії гістологічних зрізів тканини щурів імплантованої нативним перикардом ВРХ контрольної групи через 3 місяці після підшкірної імплантації (світлова мікроскопія, x200). А - відсутність імплантованого нативного перикарда, лейкоцитарна інфільтрація (фарбування гематоксилін/еозином); В - відсутній видимий імплантований нативний перикард, набряк м'язової тканини (фарбування трьохкольоровим методом по Массону).

Також в окремих ділянках зафіксовано складж-феномен, що характеризується прилипанням один до одного еритроцитів та лейкоцитів внаслідок чого викликається ускладнення перфузії крові через судини мікроциркуляторного русла та формування тромбів (рис. 4.9). Таким чином, тестування матеріалу Технології 4 не дало очікувано позитивного результату при культивуванні *in vivo*. Імплант руйнувався і спричинив запальні реакції організму. Такі результати виключають можливість використання даного матеріалу у кардіохірургічній практиці [97, 105, 144, 168].



**A**



**B**

Рис. 4.9. Мікрофотографії гістологічних зрізів децелюляризованого імплантату перикарда ВРХ Технології 4 через 3 місяці після підшкірної імплантації щурам (світлова мікроскопія, x200). А – набряк поперечно-смугастої м'язової тканини щура навколо імплантату з зоною утворення тромбів (фарбування гематоксилін/еозином); В - деградована частина імплантату (фарбування трьохкольоровим методом по Массону).

Відомий той факт, що іонний детергент SDS, здатен зв'язуватися з колагеновими волокнами, при цьому спричиняти їх руйнування та сприяти прояву набряку тканини, викликаному потенційним розривом водневих зв'язків колагенових волокон [71, 126]. Повне видалення детергенту в процесі децелюляризації не вдається за рахунок міцної взаємодії SDS з білками позаклітинного матриксу [40]. Спираючись на даний факт, Cortman та його колеги припустили, що використання SDS, як реагенту для децелюляризації, може змінити термічну стабільність колагену та вміст GAG [54]. Ning Lia та його колеги також зазначили, що залишковий вміст SDS у децелюляризованих тканинах може призвести до недостатнього повторного заселення клітинами господаря після імплантації. Тобто реагент призводить до зменшення довговічності імплантату та гальмування росту клітин на ньому в умовах *in vivo*. Ця кореляція було підтверджена дослідженнями на щурах, де навколо 1% імплантатів оброблених SDS спостерігався періімплантатний некроз [100].

В той же час, дані гістології свідчать про успішну біоінтеграцію імпланту у щурів Технології 5 (рис. 4.10). В тканинах відмічено заміщення імпланту розростаючою незрілою сполучною тканиною. Також спостерігається в зоні імпланту посилена васкуляризація сполучної тканини, формуються капіляри, які наповненні еритроцитами. Біоімплант не тільки не зруйнувався, а і став повноцінною частиною тканин дослідних тварин. У даному випадку ми використовували 0,1% SDS, концентрація якого в десять разів нижче, ніж у іншій технології. Наші результати збігаються з попередніми даними, де також було показано, що використання 0,1% SDS є кращим для децелюляризації перикарда, ніж 3% або 0,5% SDS, оскільки біологічні властивості позаклітинного матриксу краще зберігалися [151].



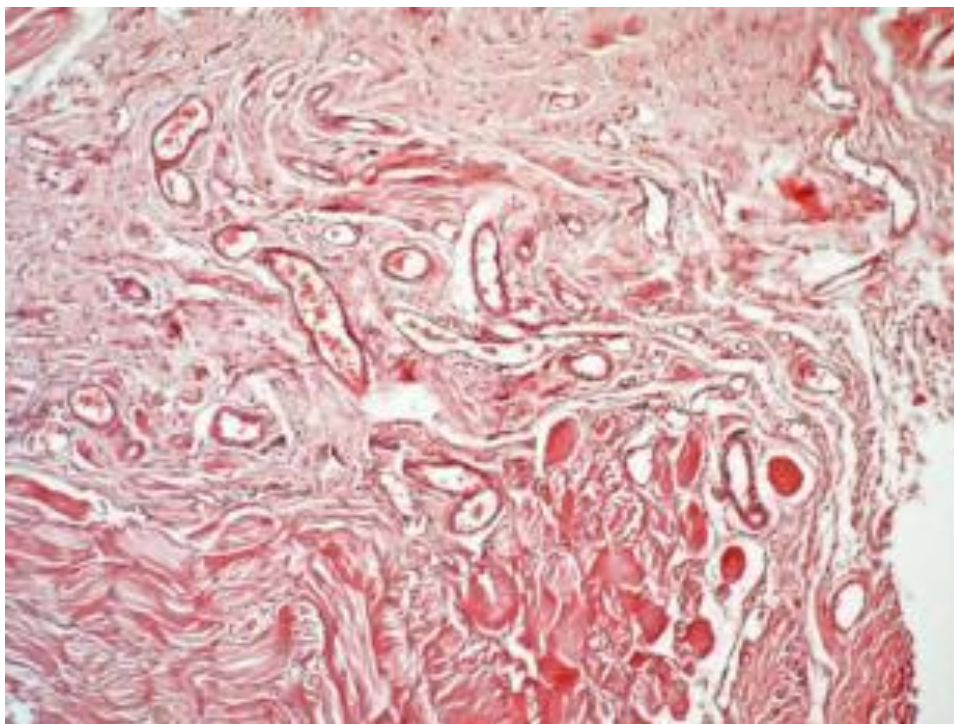
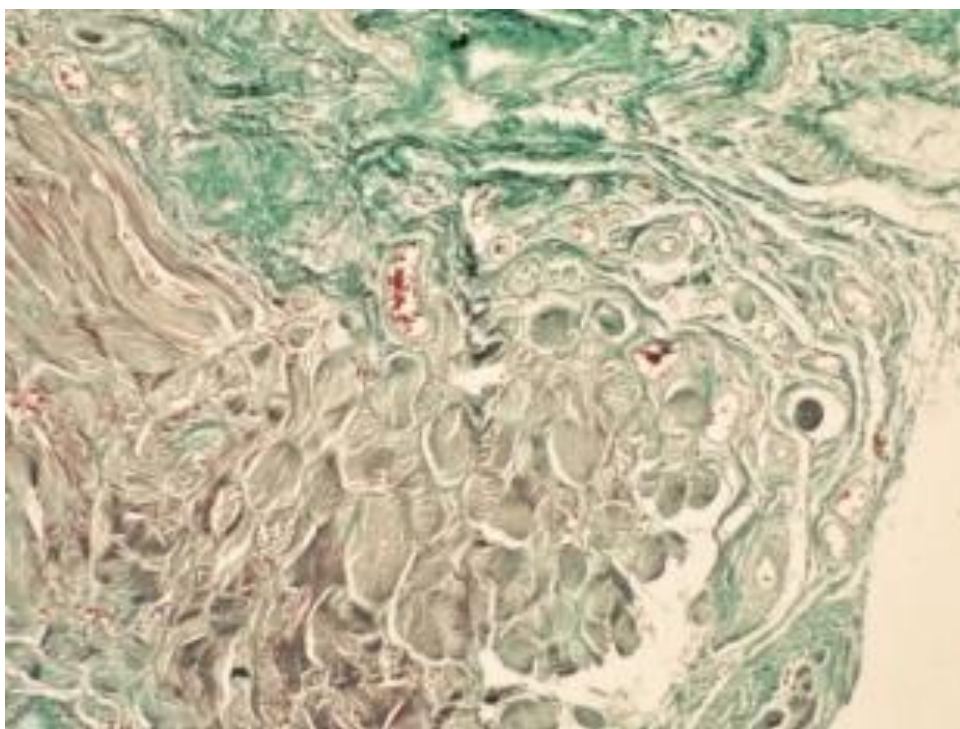
**A****B**

Рис. 4.10 Мікрофотографії гістологічних зрізів децелюляризованого імплантату перикарда ВРХ Технології 5 через 3 місяці після підшкірної імплантації щурам (світлова мікроскопія, x200). А – утворення незрілої

сполучної тканини по всій поверхні біоімпланту (фарбування гематоксилін/еозином); В - утворення незрілої тканини по всій поверхні біоімпланту та формування капілярів, насичених еритроцитами (трехкольоровий метод по Массону).

В таблиці 4.3 наведені результати аналізу біосумісності децелюляризованих тканин за Технологією 4 та Технологією 5. Аналіз проводився для 5 зразків в 5 полях зору для кожної з технологій, в результаті якого визначали ступінь вираженості запальної реакції.

Таблиця 4.3

#### Оцінка біосумісності децелюляризованого матриксу

Технології	Вираженість запальної реакції, абс. (%)					p
	Відсутність ознак	Поодинокі клітини	Невеликі фокуси	Окремі та зливні фокуси	Великі інфільтрати	
Контроль, нативний перикард (n=25)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (32,0)	17 (68,0)	<0,001
Технологія 4 (n=25)	0 (0,0)	6 (24,0)	16 (64,0)	3 (12,0)	0 (0,0)	
Технологія 5 (n=25)	24 (96,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

Примітки: для порівняння між групами використано критерій хі-квадрат, постеріорні порівняння проводилися з урахуванням поправки Бонферроні.

При проведенні аналізу виявлено статистично значиму відмінність між групами за ступінню вираженості запальної реакції ( $p < 0,001$  за критерієм хі-квадрат). При цьому ступінь вираженості запальної реакції для зразків контрольної групи (нативний перикард) була статистично значимо ( $p < 0,05$ ) вища, ніж для зразків Технології 4 та Технології 5, ступінь вираженості запальної реакції для зразків Технології 4 була статистично значимо ( $p < 0,05$ ) вища, ніж для зразків Технології 5. При цьому для Технології 5 «відсутні ознаки» запальної реакції відмічена у 96,0% (95% ДІ 84,3% – 100%) зразків.

### **Резюме**

Дослідження безпечності біоімпланту показало, що модифікована нами Технологія 5 з використанням 0,1% SDS та подальшим крос - лінкінгом NHS/EDC може застосовуватись для отримання децелюляризованого перикарду ВРХ як перспективного та безпечного тканинно інженерного матеріалу для забезпечення потреб кардіохірургії.



## **РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ (ОБГОВОРЕННЯ) РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Децелюляризація - це процедура очистки екстракорпорального матриксу від клітин та біомолекул, що застосовується для зниження антигенності, зменшуючи тим самим подальше відторгнення трансплантата та алосенсибілізацію реципієнта. На сьогодні в науковій літературі описано численні технологічні схеми щодо процесу видалення клітин із тканини [140, 147, 112], що проводяться хімічними, фізичними або комбінованими методами. В основу методу децелюляризації покладено повне видалення з тканини всіх антигенних компонентів (нуклеїнові кислоти, клітинні мембрани, цитоплазматичні структури, ліпіди та розчинний матрикс) без пошкодження структури та цілісності позаклітинного матриксу [140]. Також слід враховувати прояв цитотоксичного ефекту та біосумісність децелюляризованого матриксу, що впливає на рівень приживлення клітин при трансплантації.

Аналіз наукових даних дав змогу оцінити найефективніших технологій децелюляризації, в основі яких застосовується гіпотонічний лізис клітин, екстракція миючими та ферментативними речовинами з багаторазовим промиванням, механічне очищення та фіксація тканин [143, 121]. За даними літератури найефективнішими методами децелюляризації було визначено ті, які використовували для очистки матриксу іонний Sodium dodecyl sulfate (SDS) та неіонний Triton X-100 детергенти, гідроксид амонію. Однак, незважаючи на велику кількість переваг даних методів, все ще існує занепокоєння щодо безпечності технології децелюляризації. Тому продовжили проводитись наукові дослідження, спрямовані на підвищення міцності та чистоти виділеного перикарду.

Останнім часом підвищився інтерес до технології з використання альдегідів низької концентрації, що забезпечує створення хімічних зв'язків

між компонентами позаклітинного матриксу та запобігає розвитку гострій імунній відповіді організму. У той же час альдегідний метод має деякі недоліки щодо тривалого використання отриманої тканин [146]. Слід відзначити, що даний метод децелюляризації не очищає матрикс від специфічного тільки для тварин антигену (a1, 3)-Gal, що може бути причиною відторгнення біоімпланту [84].

Базуючись на попередніх дослідженнях, науковці [77] розробили скафолд використовуючи мезенхімальні клітини-попередники людини. Науковець помістив отримані клітини на децелюляризований каркас міокарда з фібриновим гідрогелем. Як результат, скафолд виконував функцію біомеханічної підтримки, тоді як фібрин утримував клітин в матриксу.

Guhathakurta et al. для покриття ДПМ міокарду використовували протокол з використанням полі- (L) молочною кислотою/полікапронолактоном/ колагеновими нановолокнами, що мало декілька перспективних переваг ніж раніше відомі методи [76]. Науковцями було створено міокардіальний патч, що демонстрував скорочувальну активність та експресію специфічного тропоніну I та серцевого міозину під час культивування *in vitro*.

Однак, експериментальні дані є досить суперечливими, і немає загальної згоди щодо єдиного підходу до децелюляризації перикарда. Також нами було відзначено, що досі триває пошук найкращого методу отримання інтактних скафолдів. Кожен із вище згаданих технологій та досліджень має численні переваги, але економічність та виробничі потужності викликають занепокоєння при їх подальшому використанні.

Таким чином, для успішної децелюляризації ксеногенних тканин слід враховувати коваріантний ефект, що включає в себе відповідність щодо клітинного складу (наприклад, печінка проти хряща), щільності (наприклад, клапани серця проти жирової тканини), вмісту ліпідів (наприклад, мозок

проти сечового міхура) та товщини тканини (наприклад, дерма проти перикарда). В ідеальному варіанті децелюляризація не повинна впливати на архітектуру позаклітинного матриксу та механічні властивості трансплантата [80, 120, 106].

На першому етапі дослідження було узагальнено найпоширеніші технології децелюляризації тканин з огляду на оцінку видалення клітин та механічних властивостей отриманого матриксу, та безпеки імплантації. Технологія виготовлення ДПМ складалася з наступних етапів: осмотичний шок, децелюляризація, детоксикація, стабілізація та фіксація, відмивання. Однак описані у літературі [120, 121, 135, 143, 147, 148, 159, 161] протоколи не забезпечували відтворювані результати й призводили до неприпустимої деградації структури перикарду ВРХ, тому постала задача синтезу оригінальних модифікацій протоколу виготовлення біоімпланту. Детальний аналіз кожного з етапів дозволив нам модифікувати технології та отримати ДПМ для подальшого тестування на біологічні, біомеханічні, цитотоксичні та біосумісні властивості. Таким чином, ми створили оптимальні умови для всіх технологій і внесли модифікації щодо тривалості процесу, підбору оптимальних концентрацій. Ми додали новий етап в процесингу – крос-лінкінг, що базувався на зшиванні волокон матриксу за допомогою хімічних сполук і підтриманні архітектоніки ДПМ.

В ході експерименту було модифіковано 5 технологічних схем:

Технологія 1 – Гідроксид амонію + Тритон X-100;

Технологія 2 - 1% SDS + Гідроксид амонію - Тритон X-100;

Технологія 3 - 1% SDS;

Технологія 4 - Трипсин + 1% SDS;

Технологія 5 - 0,1 % SDS.

Оцінка успішності децелюляризації проводилась за даними гістологічного, молекулярно-генетичного, біомеханічного, цитотоксичного досліджень та тесту на біосумісність. При гістологічному дослідженні при

фарбуванні зразків гематоксилін-еозином та DAPI ми спостерігали повну відсутність клітин та ядерного матеріалу в матриксі Технологій 1 та 2 на 28 день культивування. Однак ми помітили, що тканина перикарда суттєво змінилася у Технології 3 (1% SDS при 24 ° C), де візуально фіксувалась зміна структури колагенових та еластинових волокон. Очевидно, така концентрація іонного детергента негативно впливає на тканинні волокна. Однак, спостерігалось видалення всіх клітин вже через 14 днів децелюляризації. Крім того, такий ефект був підтверджений при фарбуванні зразку за DAPI, де видно, що більшість ядерних компонентів клітин видалено після емульгування миючим засобом. Отриманні результати знайшли підтвердження в попередніх дослідженнях, де при фарбуванні за методом гематоксилін-еозин також не було виявлено фіолетово зафарбованих клітин після етапу очистки тканини [147, 159]. Також ми спостерігали відсутність ядерних елементів зі збереженням структури матриксу в Технології 4 після двох тижнів децелюляризації. У Технології 5 ефект спостерігався через 21 день обробки.

Після видалення клітинних компонентів та гістологічного аналізу проводили аналіз ДНК на виявлення концентрації нуклеїнових кислот у зразках позаклітинного матриксу. Аналіз ДНК показав, що в процесі децелюляризації вдалося видалити нуклеїнові кислоти з позаклітинного матриксу, однак залишковий вміст біомолекул відрізнявся залежно від застосовуваного протоколу. Robert Ramm et.al виявили суттєві відмінності між застосованими протоколами, оскільки децелюляризація клінічно затвердженим протоколом із застосуванням додецилсульфат натрію та дезоксихолат натрію не призвела до видалення ДНК, тоді як одночасне використання трипсину та Triton X-100 продемонструвало високу ефективність [135]. Такий же результат був отриманий у зразках Технології 4 (фермент трипсин + 1% SDS) та 5 (0,1% SDS) де було зафіксовано мінімальну концентрацію ДНК, що становила менше 5 нг/мг, вже через 42 і

35 днів відповідно. Однак для Технологій 1 та 2 такого ефекту не вдалося досягти, де через 42 дні децелюляризації спостерігали високу концентрацію нуклеїнових кислот у зразках, що дорівнювала більше 150 і 120 нг/мг відповідно. Такі результати вимагали продовження процесингу матеріалу і свідчили про низьку ступінь очистки даними детергентами.

Біомеханічні властивості децелюляризованих тканин у більшості випадків відповідали нативному перикарду ВРХ. Найнижчий рівень міцності ( $F_{max}$ ) зафіксований у зразках Технології 3 ( $0,334 \pm 0,753$  кгс). У зразках даної групи ми спостерігали структурні зміни волокон матриксу. Подібний ефект був описаний Ляо та ін., де показано, що методи децелюляризації, засновані на однокомпонентному використанню миючого засобу або ферменту (0,5% SDS, 1% Triton X-100 та 0,5% трипсину), мають властивість впливати на порушення структури колагену [101, 120].

Усі інші застосовувані протоколи децелюляризації забезпечили більш відповідні біомеханічні властивості. Значення міцності тканини на розрив у зразках Технології 2, 3, 4 та 5 були приблизно однаковими ( $p < 0,05$ ). Однак слід відмітити, що зразки Технології 4 та 5 показали найвищі рівні  $F_{max}$  ( $4,582 \pm 0,581$  кгс та  $4,726 \pm 0,905$  кгс, відповідно) та були найбільш близькими до показників контрольної групи ( $6,294 \pm 0,695$  кгс), ( $p < 0,05$ ). Такі результати можуть бути пов'язані з менш тривалим впливом децелюляризованих розчинів. Значення максимальної міцності у зразках Технологій 1 та 2 були майже в 2 рази нижчими порівняно з контролем. Важливо зазначити, що ми зупинили децелюляризацію у зразках Технологій 1 та 2 після 42 днів обробки. Концентрація нуклеїнових кислот в ДПМ була досить високою, і зразки потребували подальшого впливу миючих засобів, навіть після такого тривалого часу процесу видалення клітин. Скоріш за все, що така тривала дія детергентів призвела до зниження рівня міцності отриманих тканин. Такої ж думки притримують Казимир М.Т. та ін., які у своїх наукових працях показали, що тривалий вплив миючих засобів здатний дестабілізувати

потрійний спіральний домен колагену та спровокувати набряк еластинових волокон [92].

В ході дослідження було вивчено ефект цитотоксичності для ДПМ отриманих за допомогою ферменту трипсину та іонного детергенту 0,1 % SDS з подальшим крос-лінкінгом EDC/NHS. Цитотоксичність досліджуваних зразків матриксу визначали шляхом порівняння різних гістологічних препаратів для встановлення кількості та розташування фібробластів людини, що культивувалися на отриманому тканинному каркасі. Також було проаналізовано гістологічні препарати з визначенням ступеню структурних змін волокон скафолду та взаємного розташування клітин фібробластів при довготривалому культивуванні.

В результаті дослідження не спостерігали цитотоксичного ефекту *in vitro* для матриксу Технології 5, технологія якого передбачала використання лише 0,1% SDS. Так, при мікроскопічному дослідженні спостерігали рівномірний шар клітин по поверхні, з глибоким проникненням окремих клітинна глибину до 200 мкм. Клітини комфортно росли та розмножувались на підготовлених скафолдах та виживали щонайменше протягом двох місяців. Отримані результати співпадають з даними отриманими колегами, які також показали що 0,1 % SDS підходить краще для застосування децелюляризації перикарду, ніж, 0,3 % або 0,5 % SDS, оскільки біологічні властивості скафолду були краще збережені [151]. В той же час дані наукової літератури підтверджують ефективне використання іонного детергенту SDS для процесу децелюляризації, при використанні якого очистка матриці відбувається за рахунок солюбілізації цитоплазматичної та ядерної мембран, денатурації білків, видалення ядерних залишків. Однак слід зазначити, що використання SDS може порушити структуру колагену [85, 138]. Спостереження за скафолдом отриманим за Технологією 4 (трипсин + 1% SDS) показало незначні структурні зміни колагенових та еластинових волокон тканини. При цьому місцями ми спостерігали вогнищеву деструкцію

фібробластів за умови тривалого культивування. На окремих ділянках клітини утворювали аномальні морфологічні агрегати, що можна пояснити ймовірним процесом ресинтезу волокна. Слід відзначити, що попередні дослідження, проведенні на децелюляризованій за допомогою SDS та трипсину свинячій тканині серця, не показали цитотоксичного впливу з боку скафолду на фібробласти міокарду щурів та кардіоміоцитів [166, 169]. Отже, на підставі попередніх досліджень та даних, отриманих під час нашого експерименту, ми можемо припустити, що використання SDS для децелюляризації є ефективним та доцільним у кардіохірургії. Високі концентрації іонного детергенту SDS можуть спричинити деструктивні зміни в структурі матриксу скафолду.

Проведені дослідження дали змогу оцінити ступінь придатності ксеноткани до процесу трансплантації. Було підтверджено створення механічно стійкого, функціонально надійного, неімунногенного та здатного підтримувати опосередкований клітинний ріст скафолду. Однак, ідеальний трансплантат повинен бути не тільки вільним від будь-яких клітин, довго витримувати механічні навантаження, при цьому зберігати структуру позаклітинного матриксу, а витримувати одну з найважливіших вимог до безпеки біоімпланту - бути біосумісним з організмом донора [36, 71, 126].

Цікаво, що значний ефект щодо безпеки та ефективності був досягнутий в експериментах *in vivo* з підшкірною імплантацією децелюляризованого перикарда лабораторним тваринам. Зниження імунногенності, зниження цитотоксичності та поліпшення інтеграції трансплантата спостерігали порівняно із застосуванням свіжої/замороженої або фіксованої глутаральдегідом імплантованої тканини [155, 112].

Саре Раджабі-Зелеті та ін. розробили перикардовий каркас, що імітує природне позаклітинне середовище міокарда та досліджував його властивості для інженерії серцевої тканини. Були децелюляризовані мембрани перикарда людини. Цікаво, що гістологічне дослідження

підшкірних трансплантованих каркасів через місяць виявило низьку імунологічну відповідь, посилений ангіогенез та диференціацію кардіоміоцитів у перикардіальних скафолдах порівняно з децелюляризованими мембранами перикарда та колагеновими скафолдами [61, 81, 133].

В нашому дослідженні вивчення біосумісності проводили шляхом імплантації досліджуваних зразків децелюляризованого матриксу щурам лінії Вістар в ділянку міжлопаткового простору. В якості контролю використовували нативну тканину перикарду. Через 3 місяці тварин виводили з експерименту, після чого вилучали комплекс тканин лопаточної ділянки щурів (разом із імплантованою структурою) та досліджували мікроскопічно. У тварин Технології 4 (трипсин + 1% SDS) в поперечно-смугастих м'язах прилеглих до імплантату відзначений набряк м'язових волокон і незначна лімфоцитарна інфільтрація, що свідчить про розвиток запалення. Також зафіксовано руйнування значної частини біоімпланту. Біотестування матрику Технології 4 не дало очікувано позитивного результату при культивуванні *in vivo*. Імплант руйнувався і спричинив запальні реакції організму, що виключає можливість його подальшого тестування для потреб кардіохірургії.

Дані гістології свідчать про успішну біоінтеграцію імпланту у щурів Технології 5, в зразках якої відмічено заміщення імпланту розростаючою незрілою сполучною тканиною. Також спостерігли в зоні імпланту посилену васкуляризацію сполучної тканини, формування капілярів, які були наповнені еритроцитами. Біоімплант не тільки не зруйнувався, а і став повноцінною частиною тканин дослідних тварин.

Таким чином, в результаті проведених досліджень та тестувань *in vitro* та *in vivo* підтверджено ефективність використання 0.1% розчину іонного детергенту SDS (Технологія 5) для отримання децелюляризованого позаклітинного матриксу перикарду великої рогатої худоби (табл. 5.1).



Отримані дані свідчать, про повну сприйнятливість даного імпланту організмом лабораторних тварин.

Таблиця 5.1

**Порівняльна характеристика тканини перикарду ВРХ,  
децелюляризованої різними технологіями**

Дослідження	Контроль (натив-ний перикард ВРХ)	Технологія 1 (гідроксид амонію +Тритон X- 100)	Технологія 2 (1% додецил- сульфат натрію + гідроксид амонію +Тритон X- 100)	Технологія 3 (1% додецил- сульфат натрію)	Технологія 4 (трипсин + 1% додецил- сульфат натрію)	Технологія 5 (0,1 % додецил- сульфат натрію)
Гістологічне дослідження на виявлення клітин	Виявлено базофільно зафар- бовані клітини	повна відсутність через 28 днів	повна відсутність через 28 днів	повна відсутність через 14 днів	повна відсутність через 14 днів	повна відсутність через 21 день
DAPI, флуоресценція при виявленні ядерного матеріалу**	+	+	+	+	—	—
Біомеханічні властивості. кгС, P<0,05)	6,29±0,70	4,04±0,73*	3,51±0,49*	1,33±0,75*	7,28±0,46	9,55±0,66*
Виявлення залишків НК, нг/мл*** (P<0,05)	1436±155	158±18*	128±14*	не досліджува ли	0,54±0,57*1	3,22±0,87* <sup>1</sup>
Цитотоксичність	Повна загибель клітин	не досліджували	не досліджувал и	не досліджувал и	Вогнищева деструкція фібробласті в людини	Не виявлено
Біосумісність****	++++	не досліджували	не досліджувал и	не досліджувал и	+++	+ Ангіогенез

Примітки: для порівняння між групами використано дисперсійний аналіз, постеріорні порівняння проводилися за критерієм Шеффе.

\* – відмінність від показника нативного перикарду ВРХ статистично значима,  $p < 0,05$ .

1 – відмінність від показника для групи технологія 1 статистично значима,  $p < 0,05$ .

\*\* відсутність/наявність флуоресценції ядерного матеріалу – «-» / «+».

\*\*\* високий ступінь очистки при виявленні ДНК <50 нг/мл.

\*\*\*Для отримання більш об'єктивних даних проводили напівкількісну оцінку вираженості запальної реакції: 0 – відсутність ознак; + – поодинокі клітини (нейтрофіли, лімфоцити, макрофаги, еозинофіли); ++ – невеликі фокуси; +++ – окремі та зливні фокуси; ++++ – великі інфільтрати.

За результатами проведених досліджень можна сформуувати загальну біотехнологічну схему отримання біоімплантів із перикарду ВРХ для їх подальшого застосування в клінічній практиці та доклінічних тестуваннях (рис. 5.1).

Запропонована біотехнологічна схема тканинної модифікації перикарду ВРХ передбачає наступні етапи:

**Етап 1. Забір біологічного матеріалу** здійснюється за дотримання норм біоетики. Первинним матеріалом слугує перикардальна сумка вилучена у безпородних 12 - 18 -місячних биків протягом 20 хв після забою.

**Етап 2. Децелюляризація** – процес очистки нативного перикарду ВРХ від клітин та їх компонентів. Технологія включає наступні процеси:

- осмотичний шок - стерильна дистильована вода, t 4°C, 74 год;
- децелюляризація - 0,1 % додецил сульфат натрію, t 24°C, 200 об/хв, 35 днів;
- детоксикація - дистильована H<sub>2</sub>O, t 4°C, 7 днів, 200 об/хв днів;
- стабілізація та фіксація - 70% етанол, t 4°C, 24 год, 200 об/хв;
- крос –лінкінг - стабілізація децелюляризованого матриксу методом зшивання EDC/NHS (10 мМ 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіімід, 10 мМ гідроксисукцинімід-2, 0.05 М етансульфонова кислота) та MES розчином, рН 5.6 (0.05 М етансульфонова кислота), t 24°C, 12 год, 50 об/хв;
- відмивання - 0,9 % NaCl, t 4°C, 24 год, 200 об/хв.

**Етап 3. Гістологічне дослідження біоімпланту на ступінь очистки від клітин та їх компонентів.** Передбачає використання світлової та люмінесцентної мікроскопії.

- Фарбування гематоксилін-еозин призначене для фарбування клітин, при якому ядра забарвлюються в синьо-фіолетовий колір, цитоплазма – в

жовтувато-рожевий. *Високий ступінь очистки біоімпланту* – відсутність базofilно зафарбованих клітин. *Низький ступінь очистки біоімпланту* – наявність клітин з ядром синьо-фіолетового кольору.

➤ Фарбування DAPI фіксує ядерний матеріал уже зруйнованих клітин. Флуоресценцію (світіння) нуклеїнових кислот підсилює барвник 4',6-діамідіно-2-феніліндол. *Високий ступінь очистки біоімпланту* – відсутність флуоресценції. *Низький ступінь очистки біоімпланту* – інтенсивна флуоресценція.

**Етап 4. Молекулярно-генетичне тестування, що здійснюється для визначення концентрації нуклеїнових кислот (нг/мг) у ДПМ перикарду ВРХ, передбачає:**

- обробку 10-25 мг тканини протеїназою К;
- екстракцію ДНК;
- спектрофлуориметрію при кімнатній температурі 23-24° С.

*Високий ступінь очистки біоімпланту* - <50 нг двохланцюгової ДНК в 1 мг сухої ваги позаклітинного матриксу.

**Етап 5. Біомеханічні властивості проводять для визначення максимального розривного зусилля та відносного максимального подовження ДПМ перикарду ВРХ у поздовжньому та поперечному положенні зразку.**

I. Під час випробувань реєструють:

- а) максимальне розривне зусилля, Н;
- б) подовження, мм, відносне максимальне подовження під час розриву, %.

Показники розривного зусилля і подовження при розриві фіксують після розриву зразків.

За розривне зусилля приймають середньоарифметичне значення результатів всіх вимірювань. Обчислення здійснюють з похибкою до 0,196Н (0,02 кгс) і округлюють до 0,98 Н (0,1 кгс).

Подовження зразків при розриві  $L_1$  (%) розраховують за формулою:

$$L_1 = L \cdot 100 / A,$$

де:

L - подовження при розриві, мм;

A - затискна довжина зразку, мм.

За подовження при розриві приймають середньоарифметичне значення всіх вимірювань.

Обчислення здійснюють з похибкою до 0,01% і округлюють до 0,1%.

*Високий ступінь біомеханічних властивостей біоімпланту* – показники рівні або вищі ніж нативного перикарду ВРХ.

*Низький ступінь біомеханічних властивостей біоімпланту* – показники нижчі ніж нативного перикарду ВРХ.

**Етап 6. Дослідження на цитотоксичність *in vitro*.** Посів суспензії фібробластів людини обсягом 150 мкл (150 тис. клітин) здійснюють шляхом нанесення на зволожений стандартним ростовим середовищем (ДМЕМ + 10% сироватки) децелюляризований матрикс. Моніторинг росту клітин та заміна середовища щоденно протягом 2-х місяців.

*Позитивна оцінка цитотоксичності біоімпланту* – наявність росту клітин по всій поверхні матриксу.

*Негативна оцінка цитотоксичності біоімпланту* – повна або часткова загибель клітин.

**Етап 7. Дослідження на біосумісність *in vivo*.** Імплантація лабораторним тваринам - 4–5-місячних щурам самцям лінії Вістар (n = 15) масою 190–230 г.

Аналіз гістологічних змін структури біоімпланту та наявності тканинної реакції організму проводять мікроскопічно через 3 місяці.

Маркерами успішного приживлення або, навпаки, біодеструкції різних груп тканин ксеноперикарда при підшкірній імплантації є наступні морфологічні показники: 1 – зміна структури; 2 – інтенсивність і тривалість запальної

реакції з боку тканин реципієнта; 3 – час формування капсули і ступінь її зрілості; 4 – ступінь збереження клітинного компонента; 5 – швидкість відновлення первинної структури тканин ложа реципієнта.

**Етап 8. Доклінічні/клінічні тестування біоімпланту в кардіохірургічній практиці.**

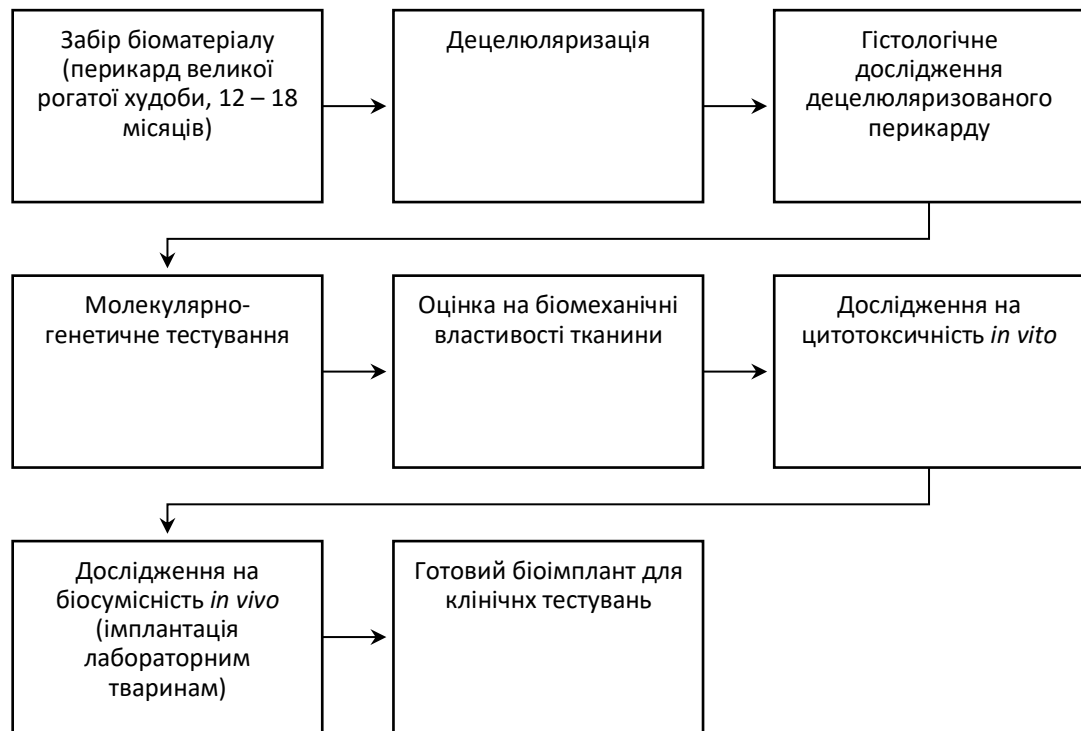


Рис. 5.1. Загальна схема біотехнології одержання біоімпланту із перикарду ВРХ

### Резюме

Узагальнено досвід отримання децелюляризованого перикарду ВРХ, на основі чого проведено синтез 5 оригінальних технологій. Ефективність модифікованих технологій була протестована при гістологічному, мікроскопічному, біомеханічному, молекулярно-генетичному аналізі. Показано, що екстрацелюлярний матрикс перикарду зберігає свою цілісність і фізико-механічні властивості близькі до нативного перикарду ВРХ після етапу децелюляризації. Виключення становить використання високої

концентрації однокомпонентного детергенту sodiум додецил сульфату, для якого зафіксовано порушення архітекtonіки скафолду. В умовах *in vitro* вивчено цитотоксичний вплив скафолду на клітини людини. При імплантації лабораторним тваринах в умовах *in vivo* вивчались біосумісні властивості імпланту. Підтверджено ефективність використання модифікованої технології отримання децелюляризованого позаклітинного матриксу перикарду великої рогатої худоби на основі 0.1% розчину іонного детергенту sodiум додецил сульфату та етапу крос-лінкінгу для моделювання кардіоімпланту.

## ВИСНОВКИ

У дисертації теоретично узагальнено й наведено нові шляхи розв'язання наукової задачі, що стосується розробки біотехнології створення тканинних імплантів для застосування в кардіохірургії. Результати досліджень дають змогу зробити такі висновки.

1. Розроблено п'ять оригінальних модифікованих технологій виготовлення децелюляризованого матриксу перикарда ВРХ, які відрізнялися за умовами процесингу, а саме: збільшення тривалості осмотичного лізису до 72 год; підвищення до +24 °С температурного режиму децелюляризації для Технології 3; підбір оптимального часу децелюляризації для Технологій 1, 2 – 42 доби, для Технології 3 – 14 діб, для Технології 4 – 28 діб, для Технології 5 – 35 діб; додано новий етап процесингу – крос-лінкінг.

2. На підставі результатів вивчення морфологічних змін децелюляризованих тканин перикарда ВРХ визначено найбільш ефективні технологічні схеми, що забезпечують повну елімінацію клітин донора. Модифіковані Технології 4 і 5, що передбачають використання ферменту трипсину + 1 % іонного детергенту SDS та 0,1 % SDS, продемонстрували задовільні децелюляризаційні властивості. Повна елімінація клітин донора після процесу очистки для Технології 4 фіксувалась через 14 днів, а для Технології 5 – через 21 день. Результати гістологічного дослідження показали відсутність ядрових елементів у тканин Технологій 1 і 2 на 28-й день культивування, а для Технології 3 такий результат зафіксовано вже на 14-й день біотехнологічного процесу. Для Технологій 1 і 3 відсутність клітинних елементів у тканин відзначена у 88,0 % (95 % ДІ 71,8–97,8 %) зразків, для Технології 2 – у 84,0 % (95 % ДІ 66,4–95,9 %) зразків, для Технології 4 – у 92,0 % (95 % ДІ 77,6–99,4 %) зразків, для Технології 5 – у 96,0 % (95 % ДІ 84,3–100 %) зразків. Морфологічний аналіз структури тканини, обробленої 1 % SDS за кімнатної температури, відповідно до схеми Технології 3, показав зміну просторової Забір біоматеріалу (перикард великої

рогатої худоби, 12–18-місячні бики) Децелюляризація Гістологічне дослідження децелюляризованого перикарда Молекулярногенетичне тестування Оцінка біомеханічних властивостей тканини Дослідження на цитотоксичність *in vitro* Дослідження на біосумісність *in vivo* (імплантація лабораторним тваринам) Біоімплант для клінічних тестувань структури колагенових волокон із незворотним і дегенеративним ефектом на тканину перикарда.

3. Визначено ступінь очистки від нуклеїнових кислот для досліджуваних технологій. Люмінесценція за методом DAPI спостерігалась у зразків Технологій 1, 2 і 3 навіть при повній елімінації живих клітин, що свідчить про низький ступінь очистки від біомолекул при використанні таких детергентів, як гідроксид амонію, тритон X-100 та 1 % SDS у біотехнологічному процесі трансформації тканини. Найефективнішим очищення тканини ядрового матеріалу було при застосуванні трипсину + 1 % SDS та 0,1 % SDS. Для Технології 4 відсутність люмінесценції спостерігалась на 14-й день децелюляризації у 92,0 % (95 % ДІ 77,6–99,4 %) зразків, для Технології 5 – у 96,0 % (95 % ДІ 84,3–100 %) зразків на 21-й день децелюляризації.

4. Показано зменшення кількості ДНК у біоімпланті при збільшенні часу процесингу в усіх тестових групах. Встановлено, що в Технологіях 4 і 5 видалення нуклеїнових кислот пройшло 99,9 % ( $p < 0,05$ ), при детекції ДНК  $0,54 \pm 0,57$  та  $3,22 \pm 0,87$  нг/мг через 28 і 35 днів відповідно. Висока кількість біомолекул ядрового матеріалу фіксувалась при застосуванні протоколів 1 і 2, що становило  $158 \pm 18$  і  $128 \pm 14$  нг/мг відповідно навіть на 42-й день біотехнологічної трансформації перикарда ВРХ.

5. Визначено зміни пружно-міцнісних властивостей децелюляризованого різними технологіями перикарда ВРХ. Показано найнижчий рівень  $F_{\max}$  – максимальної сили розтягнення – ( $1,33 \pm 0,75$  кгс) для зразків Технології 3, що в 5 разів нижче ( $p < 0,01$ ) порівняно з контролем



( $6,84 \pm 0,70$  кгс). Не встановлено ефективності використання технологічних протоколів 1 і 2 для отримання біоімпланту, де показники  $F_{\max}$  майже в 2 рази нижчі порівняно з нативним перикардом. Доведено наявність високих пружно-міцнісних властивостей для скафолдів, отриманих за технологічними схемами 4 і 5.  $F_{\max}$  унаслідок порушення цілісності матеріалу становила  $7,28 \pm 0,46$  і  $9,54 \pm 0,65$  кгс відповідно, що вище контролю ( $p < 0,05$ ).

6. Показано, що децелюляризований позаклітинний матрикс перикарда ВРХ за допомогою трипсину в поєднанні з 1 % SDS не дає цитотоксичного ефекту при культивуванні протягом 1-го місяця. При спостереженні до 2-х місяців фіксується вогнищева деструкція фібробластів людини з морфологічними змінами структури волокон матриксу. Для Технології 4 відсутність цитотоксичного ефекту відзначена у 64,0 % (95 % ДІ 43,6–82,1 %) зразків, тоді як для Технології 5 – у 92,0 % (95 % ДІ 77,6–99,4 %) зразків ( $p = 0,04$ ). Клітини були нормальної морфології, формували на поверхні скафолду рівномірні пласти, значна частина яких проникла в товщу тканини не більше ніж на 150–200 мкм.

7. Встановлено розвиток запальної реакції в м'язових волокнах лабораторних тварин при ксеноімплантації тканини, децелюляризованої за Технологією 4 з використанням 1 %-ного іонного детергенту SDS у поєднанні з ферментом трипсином і процесом крос-лінкінгу. Гістологічно доведено значне руйнування імпланту після 2-місячного експерименту *in vivo*, що свідчить про відторгнення цього скафолду і неможливість його подальшого використання в кардіохірургії.

8. Доведено високу біоінтергацію імпланту, децелюляризованого за Технологією 5 з використанням 0,1 % SDS із подальшим крос-лінкінгом. Гістологічне дослідження показало часткове заміщення матриксу розростаючою незрілою сполучною тканиною та посиленою її васкуляризацією з формуванням капілярів, наповнених еритроцитами. Відсутність запальної імунної реакції для Технології 5, що відзначена у 96,0

% (95% ДІ 84,3–100 %) зразків, доводить сприйнятливість біотехнологічно модифікованої тканини, що робить її перспективною для подальшої розробки до застосування в клінічній практиці.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абдрашипова ЭХ, Зайцев ТИ, Комаровская ТП. Стандартизация лабораторных животных по состоянию здоровья. Ланималогия. 1993;1:7-12.
2. Астапов ДА, Караськов АМ, Ким МВ, Семенова ЕИ, Демидов ДП. Отдаленные результаты протезирования трикуспидального клапана биологическими протезами: ретроспективное исследование. Тихоокеанский медицинский журнал. 2013;3:40-3.
3. Ахмедов ШД, Афанасьев СА, Дьякова МЛ, Фатхутдинов ТХ, Кактурский ЛВ. Использование бесклеточного матрикса для формирования новых кровеносных сосудов и сердца методом тканевой инженерии. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2009;4(2):32-9.
4. Базылев ВВ, Немченко ЕВ, Карнахин ВА, Коциенко АС. Применение ксеноперикардальной заплаты «Кардиоплант» при реконструкции корня аорты по методике Nicks-Nunez. Инновационные имплантаты в хирургии. В: Сборник трудов НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Ч. 3. Москва; 2014. с. 84-91.
5. Венедиктов АА. Разработка биоматериалов для реконструктивной хирургии на основе ксеноперикардальной ткани [диссертация]. Пенза: Пензенский государственный университет; 2014. 126 с.
6. Гур'янов ВГ, Лях Ю Є, Парій ВД, Короткий ОВ, Чалий ОВ, Чалий КО, та ін. Посібник з біостатистики. Аналіз результатів медичних досліджень у пакеті EZR (R-statistics). Київ: Вістка; 2018. 208 с.
7. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Киев: Наукова думка; 1994. 143 с.
8. Иванов АС, Иванов ВА, Балоян ГМ, Евсеев ЕП, Шехтер АБ, Милованова ЗП. Ксенопластика в реконструктивной хирургии сердца и сосудов. Результаты 20-летнего использования пластических материалов на основе ксеноперикарда. В: Материалы Всероссийской конференции с

международным участием Биопротезы в сердечно-сосудистой хирургии; 2001 июнь 21-23; Кемерово. с. 41-3.

9. Іванов ЯЮ, Романюк ОМ, Бабляк ОД, Сегал ЄВ, Ємець ІМ. Реконструкція вихідного тракту правого шлуночка при радикальній корекції спільного артеріального стовбура. Серцево-судинна хірургія. 2011;19:175-8.

10. Караськов АМ, Шарифулин РМ, Богачев-Прокофьев АВ, Демин ИИ, Железнев СИ, Опен АБ. Коррекция аортальных пороков в сочетании с расширением восходящей аорты у взрослых пациентов: сравнение процедуры Росса и операции Бенталла-Де Боно. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015;19(3):50-7. DOI: 10.21688/1681-3472-2015-3-50-57

11. Карпенко АА, Стародубцев ВБ, Игнатенко ПВ, Кужугет РА, Ким ИН, Горбатов ВН. Непосредственные и отдаленные результаты различных методов реконструкции каротидной бифуркации. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2013;1:21-4. DOI: 10.21688/1681-3472-2013-1-21-24

12. Клышников КЮ, Овчаренко ЕА, Мальцев ДА, Журавлева ИЮ. Сравнительная характеристика гидродинамических показателей биопротезов клапанов сердца «ЮниЛайн» и «ПериКор». Клиническая физиология кровообращения. 2013;1:45-51.

13. Клинические рекомендации по ведению взрослых пациентов с врожденными пороками сердца. Москва: Изд-во НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2010; 358 с.

14. Лебедь ИГ, Руденко НН, Бабляк АД, Романюк АН, Емец ИН. Анализ оказания хирургической помощи взрослым с врожденными пороками сердца. Крымский терапевтический журнал. 2014;2:112-7.

15. Лебідь ІГ, Разінкіна АО, Сидоренко АЮ, Климишин ЮІ, Романюк ОМ, Лебедь ЄІ, та ін. Комплексне оцінювання якості життя та адаптації до фізичного навантаження у дорослих пацієнтів після операції легеневого аутографта. Вісник серцево-судинної хірургії. 2017;2:56-62.

16. Лещенко ВГ, Ильич ГК. Медицинская и биологическая физика. Минск: Новое знание; Москва: ИНФРА-М; 2017. с. 84-93.
17. Мейха Б, редактор. Вирусология. Методы. Москва: Мир; 1988. 344 с.
18. Малиновский НН, Константинов БА, Дземешкевич СЛ. Биологические протезы клапанов сердца. Москва: Медицина; 1988. 255 с.
19. Пинаев ГП, редактор. Методы культивирования клеток. Ленинград: Наука; 1988. 319 с.
20. Петри А, Сэбин К. Наглядная статистика в медицине. Москва: ГЭОТАР-МЕД; 2003. 144 с.
21. Репин НВ, Марченко ЛН, Говоруха ТП, Михайлова ИП, Манченко АА, Сандомирский БП. Ультраструктура тканей перикарда и створок аортального клапана свиньи, девитализированных крио- и радиационным воздействием. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015; 25(3): 246–54.
22. Романюк ОМ, Климишин ЮІ, Руденко НМ, Довгань ОМ, Ємець ІМ. Двадцятирічний досвід операції легеневого аутографта. Вісник серцево-судинної хірургії. 2018;1:60-3.
23. Романюк ОМ, Кондрачук ОС, Ялинська ТА, Іванов ЯЮ, Ємець ІМ. Синтетичні тристулкові кондуїти в кардіохірургії вроджених вад серця. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2010;18:221-3.
24. Руденко НМ, Куриляк ОБ, Мальская АА. Дорослі пацієнти із коригованими вродженими вадами серця. Таврический медико-биологический вестник. 2009;2:55-6.
25. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. 4-е изд. Женева, ВОЗ; 2005. 111 с.
26. Севастьянов ВИ, Кирпичников МП. Биосовместимые материалы. Москва: МИА; 2011. 511 с.

27. Серов ВВ. Соединительная ткань. Функциональная морфология и общая патология. Москва: Медицина; 1981. 312 с.
28. Столяров МС. Клинико-функциональная оценка пластики сонных артерий заплатой из ксеноперикарда, обработанного диэпоксисоединениями, при каротидной эндартерэктомии [автореферат диссертации]. Новосибирск: Научно-исследовательский институт кардиологии Томского научного Центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук; 2008.
29. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. Москва: Мир; 1989. 332 с.
30. Фунг ЗХШ. Отдаленные результаты имплантации ксеноперикардальных кондуитов при хирургической коррекции аневризмы восходящей аорты [диссертация]. Москва: Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского; 2012.
31. Хлусов ИА. Основы биомеханики биосовместимых материалов и биологических тканей. Томск: Изд-во Томского политехнического университета; 2007. 149 с.
32. Чернов ИИ, Козьмин ДЮ, Макеев СА, Демецкая ВВ, Тарасов ДГ. Непосредственные результаты модифицированной операции Росса. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2016;20:(1):12-8. DOI: 10.21688/1681-3472-2016-1-12-18
33. Чернявский АМ, Ларионов ПМ, Столяров МС, Стародубцев ВВ. Структурная трансформация ксеноперикарда после имплантации в сонную артерию. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2007;4:37-40.
34. Чеснов ЮМ. Биосовместимость ксеноперикарда, фиксированного эпоксидными соединениями, в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. В: Манак НА, редактор. Актуальные вопросы кардиологии. Ч. 2. Минск: Энциклопедикс; 2002. с. 188-90.

35. Шарыкин АС. Врожденные пороки сердца. Москва: Теремок; 2005. 384 с.
36. Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*. 2016;86:68-82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.003
37. Alizadeh M, Rezakhani L, Soleimannejad M, Sharifi E, Anjomshoa M, Alizadeh A. Evaluation of vacuum washing in the removal of SDS from decellularized bovine pericardium: Method and device description. *Heliyon*. 2019;5(8):e02253. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02253
38. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological stains: A literature review and case study. *Global J Health Sci*. 2016;8(3):72-9. DOI: 10.5539/gjhs.v8n3p72
39. Amrhein V, Korner-Nievergelt F, Roth T. The earth is flat ( $p > 0.05$ ): significance thresholds and the crisis of unreplicable research. *PeerJ*. 2017;5:e3544. DOI: 10.7717/peerj.3544
40. Andrée B, Bela K, Horvath T, Lux M, Ramm R, Venturini L. Successful re-endothelialization of a perfusable biological vascularized matrix (BioVaM) for the generation of 3D artificial cardiac tissue. *Basic Res Cardiol* 2014;109(6):441. DOI: 10.1007/s00395-014-0441-x
41. Ayala P, Dai E, Hawes M, Liu L, Chaudhuri O, Haller CA. Evaluation of a bioengineered construct for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Aug;106(6):2345-54. DOI: 10.1002/jbm.b.34042
42. Bagno A, Aguiari P, Fiorese M, Iop L, Spina M, Gerosa G. Native bovine and porcine pericardia respond to load with additive recruitment of collagen fibers. *Artif Organs*. 2018;42(5):540-8. DOI: 10.1111/aor.13065
43. Baumgartner H, Bonhoeffer P, de Groot NMS, de Haan F, Deanfield JE, Galie N, et al. ESC Guidelines for the management of grown-up congenital

heart disease (new version 2010). *Eur Heart J*. 2010 Dec;31(23):2915-57. DOI: 10.1093/eurheartj/ehq249

44. Bell D, Prabhu S, Betts K, Justo R, Venugopal P, Karl TR, Alphonso N. Durability of tissue-engineered bovine pericardium (CardioCel®) for a minimum of 24 months when used for the repair of congenital heart defects. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2019 Feb 1;28(2):284-90. DOI: 10.1093/icvts/ivy246

45. Biasi GM, Sternjakob S, Mingazzini PM, Ferrari SA. Nine-year experience of bovine pericardium patch angioplasty during carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*. 2002 Aug;36(2):271-7. DOI: 10.1067/mva.2002.123685

46. Binet JP, Carpentier A, Langlois J, Duran C, Colvez P. Implantation of heterogenic valves in the treatment of aortic cardiopathies. *C R Acad Hebd Seances Acad Sci D*. 1965 Dec 20;261(25):5733-4.

47. Brown JW, Ruzmetov M, Rodefeld MD, Vijay P, Turrentine MW. Right ventricular outflow tract reconstruction with an allograft conduit in non-Ross patients- risk factors for homograft dysfunction and failure. *Ann Thorac Surg*. 2005;80(2):655-63. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2005.02.053

48. Cardiovascular implants: Cardiac valve prostheses. ANSI/AAMI/ISO 5840. Arlington: AAMI; 2005.

49. Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W, et al. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs*. 2010;34(3):206-10. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2009.00796.x

50. Chen FM, Liu X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog Polym Sci*. 2016;53:86-168. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004

51. Collatusso C, Roderjan JG, Vieira ED, Myague NI, de Noronha L, da Costa FDA. Decellularization as an anticalcification method in stentless bovine



pericardium valve prosthesis: A study in sheep. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. Jul-Sep 2011;26(3):419-26. DOI: 10.5935/1678-9741.20110017

52. Colquhoun D. The reproducibility of research and the misinterpretation of p-values. *R Soc Open Sci*. 2017;4:171085. DOI: 10.1098/rsos.171085

53. Chang Y, Liang HC, Wei HJ, Chu CP, Sung HW. Tissue regeneration patterns in acellular bovine pericardia implanted in a canine model as a vascular patch. *J Biomed Mater Res A*. 2004 May 1;69(2):323-33. DOI: 10.1002/jbm.a.30003

54. Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: Biomechanical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res*. 1994;28(6):655-66. DOI: 10.1002/jbm.820280602

55. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(12):3233-43. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057

56. Cunanan CM, Cubbling CM, Dinh TT, Shen SH, Tran-Hata P, Rutledge JH 3rd, et al. Tissue characterization and calcification potential of commercial bioprosthetic heart valve. *Ann Thorac Surg*. 2001 May;71(5 Suppl):S417-21. DOI: 10.1016/s0003-4975(01)02493-6.

57. Curtis MW, Russell B. Cardiac tissue engineering. *J Cardiovasc Nurs*. 2009 Mar-Apr;24(2):87-92. DOI: 10.1097/01.JCN.0000343562.06614.49

58. Da Cruz E, Ivy D, Jagers J, editors *Pediatric and congenital cardiology, cardiac surgery and intensive care*. London: Springer-Verlag London; 2014. 3572 p.

59. David TE, David C, Woo A, Manlhiot C. The Ross procedure: outcomes at 20 years. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;147(1):85-93. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2013.08.007

60. David TE. The surgical treatment of patients with prosthetic valve endocarditis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;7(1):47-53.
61. Douglas JF, Gaughran ER, Henderson J, Lord GH, Rosenberg N. The use of arterial implants prepared by enzymatic modification of arterial heterografts. II. The physical properties of the elastica and collagen components of the arterial wall. *AMA Arch Surg.* 1957 Jan;74(1):89-95. DOI: 10.1001/archsurg.1957.01280070093011
62. Etnel JRG, Elmont LC, Ertekin E, Mokhles MM, Heuvelman HJ, Roos-Hesselink JW, et al. Outcome after aortic valve replacement in children: A systematic review and meta-analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2016 Jan;151(1):143-52. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2015.09.083
63. Filippi A, Dal Sasso E, Iop L, Armani A, Gintoli M, Sandri M, et al. Multimodal label-free ex vivo imaging using a dual-wavelength microscope with axial chromatic aberration compensation. *J Biomed Opt.* 2018 Mar;23(9):1-9. DOI: 10.1117/1.JBO.23.9.091403
64. Faulk DM, Carruthers CA, Warner HJ, Kramer CR, Reing JE, Zhang L, et al. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomater.* 2014 Jan;10(1):183-93. doi: 10.1016/j.actbio.2013.09.006.
65. Fishbein MC, Levy RJ, Ferrans VJ, Dearden LC, Nashef A, Goodman AP, et al. Calcification of cardiac valve bioprostheses: Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1982 Apr;83(4):602-9. DOI: 10.1016/S0022-5223(19)37251-4
66. Freshney RI. Culture of specific cell types. In: Freshney RI, editor. *Culture of animal cells.* New York: Wiley Online Library; 2005. p. 375-420. DOI: 10.1002/0471747599.cac023

67. Garreta E, Oria R, Tarantino C, Pla-Roca M, Prado P, Fernández-Avilés F, et al. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. *Mater Today*. 2017;20(4):166-78. DOI: 10.1016/j.mattod.2016.12.005
68. Gaziano T, Reddy KS, Paccaud F, Horton S, Chaturvedi V, Jamison DT, et al. Cardiovascular Disease. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, et al., editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd edition. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank; New York: Oxford University Press; 2006. Chapter 33.
69. Gelchu T, Abdela J. Drug therapy problems among patients with cardiovascular disease admitted to the medical ward and had a follow-up at the ambulatory clinic of Hiwot Fana Specialized University Hospital: The case of a tertiary hospital in eastern Ethiopia. *SAGE Open Med*. 2019 Jul 18;7:2050312119860401. DOI: 10.1177/2050312119860401
70. Giesenhausen B, Martin N, Jung O, Barbeck M. Bone augmentation and simultaneous implant placement with allogenic bone rings and analysis of its purification success. *Materials (Basel)*. 2019 Apr 19;12(8):1291. DOI: 10.3390/ma12081291.
71. Gilbert WT, Sellaro LT, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006 Jul;27(19):3675-83. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014
72. Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9831534. DOI: 10.1155/2017/9831534
73. Gratzer PF, Harrison RD, Woods T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. *Tissue Eng*. 2006 Oct;12(10):2975-83. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2975

74. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de-Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 Apr;27(4):566-71. DOI: 10.1016/j.ejcts.2004.12.052
75. Grimsley BR, Wells JK, Pearl GJ, Garrett WV, Shutze WP, Talkington CM, et al. Bovine pericardial patch angioplasty in carotid endarterectomy. *Am Surg.* 2001 Sep;67(9):890-5.
76. Guhathakurta S, Mathapati S, Bishi D K, Rallapalli S, Cherian KM. Nanofiber-reinforced myocardial tissue-construct as ventricular assist device. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2014 Oct;22(8):935-43. DOI: 10.1177/0218492314523627
77. Godier-Furnémont AFG, Martens TP, Koeckert MS, Wan L, Parks J, Arai K, et al. Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 10;108(19):7974-9. DOI: 10.1073/pnas.1104619108
78. Gauvin R, Marinov G, Mehri Y, Klein J, Li B, Larouche D, et al. A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants. *J Biomater Appl.* 2013 Nov;28(4):552-65. DOI: 10.1177/0885328212465482
79. Hruska KA. Vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of vascular calcification. *Circ Res.* 2009 Mar 27;104(6):710-1. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.195487
80. Herheliuk T, Perepelytsina O, Ostapchenko L, Sydorenko M. Effect of interferon  $\alpha$ -2b on multicellular tumor spheroids of MCF-7 cell line enriched with cancer stem cells. *Innov Biosyst Bioeng.* 2019;3(1):34-44. DOI: 10.20535/ibb.2019.3.1.157388

81. Hoch J, Jarrell BE, Schneider T, Williams SK. Endothelial cell interactions with native surfaces. *Ann Vasc Surg.* 1989 Apr;3(2):153-9. DOI: 10.1016/S0890-5096(06)62009-8
82. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Jun 19;39(12):1890-900. DOI: 10.1016/s0735-1097(02)01886-7
83. Holzapfel GA, Ogden RW, editors. *Biomechanics of soft tissue in cardiovascular systems.* Vienna: Springer; 2004. 342 p. DOI: 10.1007/978-3-7091-2736-0
84. Huai G, Qi P, Yang H, Wang Y. Characteristics of  $\alpha$ -Gal epitope, anti-Gal antibody,  $\alpha$ 1,3 galactosyltransferase and its clinical exploitation (Review). *Int J Mol Med.* 2016 Jan;37(1):11-20. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2397
85. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K, et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004 Nov-Dec;10(11-12):1641-51. DOI: 10.1089/ten.2004.10.1641
86. Izutani H, Gundry SR, Vricella LA, Xu H, Bailey LL. Right ventricular outflow tract reconstruction using a Goretex membrane monocusp valve in infant animals. *ASAIO J.* 2000 Sep-Oct;46(5):553-5. DOI: 10.1097/00002480-200009000-00008
87. Jaganathan SK, Supriyanto E, Murugesan S, Balaji A, Asokan MK. Biomaterials in cardiovascular research: applications and clinical implications. *Biomed Res Int.* 2014;2014:459465. DOI: 10.1155/2014/459465
88. Jelev L, Surchev L. A novel simple technique for en face endothelial observations using water-soluble media -'thinned-wall' preparations. *J Anat.* 2008;212(2):192-7. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2007.00844.x
89. Jeong S, Yoon EJ, Lim HG, Sung SC, Kim YJ. The Effect of space fillers in the cross-linking processes of bioprosthesis. *Biores Open Access.* 2013 Apr;2(2):98-106. DOI: 10.1089/biores.2012.0289

90. Jones JM, Sarsam MA. Partial mitral valve replacement for acute endocarditis. *Ann Thorac Surg.* 2001;72(1):255-7. DOI: 10.1016/S0003-4975(00)02582-0
91. Kalfa D, Mohammadi S, Kalavrouziotis D, Kharroubi M, Doyle D, Marzouk M. Long-term outcomes of the Ross procedure in adults with severe aortic stenosis: single-centre experience with 20 years of follow-up. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015 Jan;47(1):159-67. DOI: 10.1093/ejcts/ezu038
92. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, Simon P. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs.* 2003 May;26(5):421-7. DOI: 10.1177/039139880302600508
93. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods.* 2015 Aug;84:25-34. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005
94. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Mar;48(3):452-8. DOI: 10.1038/bmt.2012.244
95. Kim GE, Kwon TW, Cho YP, Kim DK, Kim HS. Carotid endarterectomy with bovine patch angioplasty: a preliminary report. *Cardiovasc Surg.* 2001 Oct;9(5):458-62. DOI: 10.1016/s0967-2109(01)00042-4
96. Koh M, Yagihara T, Uemura H, Kagisaki K, Hagino I, Ishizaka T, et al. Long-term outcome of right ventricular outflow tract reconstruction using a handmade tri-leaflet conduit. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005 May;27(5):807-14. DOI: 10.1016/j.ejcts.2005.01.060
97. Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Ingham E, Fisher J. In-vitro assessment of the functional performance of the decellularized intact porcine aortic root. *J Heart Valve Dis.* 2005 May;14(3):408-21.

98. Kc P, Hong Y, Zhang G. Cardiac tissue-derived extracellular matrix scaffolds for myocardial repair: advantages and challenges. *Regen Biomater*. 2019 Aug;6(4):185-99. DOI: 10.1093/rb/rbz017
99. Krishnamoorthy G, Sehgal PK, Mandal AB, Sadulla SJ Development of D-lysine-assisted 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide/N-hydroxy-succinimide-initiated cross linking of collagen matrix for scaffold design. *Biomed Mater Res A*. 2013 Apr;101(4):1173-83. DOI: 10.1002/jbm.a.34411
100. Li N, Li Y, Gong D, Xia C, Liu X, Xu Z. Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility. *Interactive Cardiovasc Thorac Surg*. 2018 May 1;26(5):768-76. DOI:10.1093/icvts/ivx416
101. Liao J, Joyce EM, Sacks MS. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(8):1065-74. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.007
102. Lima EO, Ferrasi AC, Kaasi A. Decellularization of human pericardium with potential application in regenerative medicine. *Arq Bras Cardiol*. 2019 Aug 8;113(1):18-9. DOI: 10.5935/abc.20190130
103. Lop L, Palmosi T, Dal Sasso E, Gerosa G. Bioengineered tissue solutions for repair, correction and reconstruction in cardiovascular surgery. *J Thorac Dis*. 2018 Jul;10(Suppl 20):S2390-411. DOI: 10.21037/jtd.2018.04.27
104. Lopez-Moya M, Melgar-Lesmes P, Kolandaivelu K, de la Torre Hernández JM, Edelman ER, Balcells M. Optimizing glutaraldehyde-fixed tissue heart valves with chondroitin sulfate hydrogel for endothelialization and shielding against deterioration. *Biomacromolecules*. 2018 Apr 9;19(4):1234-44. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00077
105. Luo J, Korossis SA, Wilshaw SP, Jennings LM, Fisher J, Ingham E. Development and characterization of acellular porcine pulmonary valve scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2014 Nov;20(21-22):2963-74. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0573

106. Lutsenko TN, Kovalenko MV, Galkin OY. Validation of biological activity testing procedure of recombinant human interleukin-7. *Ukr Biochem J*. 2017;89(1):82-9. DOI: 10.15407/ubj89.01.082
107. Lynch AP, Ahearne M. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Exp Eye Res*. 2013 Mar;108:42-7. DOI: 10.1016/j.exer.2012.12.012
108. Manchenko AA, Mikhaylova IP, Repin NV, Sandomirsky BP. Tissue implants out of pericardium and porcine aortic valve leaflets tissues. *Proceedings of the Annual Scientific Conference & AGM. Freezing biological time: 50<sup>th</sup> Anniversary Celebration*; 2014 Oct 8–10; London: Book of Abstracts. 2014. P. 76.
109. Mallis P, Michalopoulos E, Dimitriou C, Kostomitsopoulos N, Stavropoulos-Giokas C. Histological and biomechanical characterization of decellularized porcine pericardium. *Biomed Mater Eng*. 2017;28(5):477-88. DOI: 10.3233/BME-171689
110. Martin C, Sun W. Biomechanical characterization of aortic valve tissue in humans and common animal models. *J Biomed Mater Res A*. 2012 Jun;100(6):1591-9. DOI: 10.1002/jbm.a.34099
111. Mastrobuoni S, de Kerchove L, Solari S, Astarci P, Poncelet A, Noirhomme P, et al. The Ross procedure in young adults: over 20 years of experience in our Institution. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2016 Feb;49(2):507-12. DOI: 10.1093/ejcts/ezv053
112. Mirsadraee S, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Hunt J, Fisher J, et al. Biocompatibility of acellular human pericardium. *J Surg Res*. 2007 Dec;143(2):407-14. DOI: 10.1016/j.jss.2007.01.026
113. Mc Namara K, Alzubaidi H, Jackson JK. Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integr Pharm Res Pract*. 2019 Feb 4;8:1-11. DOI: 10.2147/IPRP.S133088



114. Merna N, Robertson C, La A, George SC. Optical imaging predicts mechanical properties during decellularization of cardiac tissue. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013 Oct;19(10):802-9. DOI: 10.1089/ten.TEC.2012.0720
115. Methe K, Bäckdahl H, Johansson BR, Nayakawde N, Dellgren G, Sumitran-Holgersson S. An alternative approach to decellularize whole porcine heart. *Biores Open Access*. 2014 Dec 1;3(6):327-8. DOI: 10.1089/biores.2014.0046
116. Mitragotri S, Lahann J. Physical approaches to biomaterial design. *Nat Mater*. 2009 Jan; 8(1):15-23. DOI: 10.1038/nmat2344
117. Mueller C, Dave H, Prêtre R. Surgical repair of aorto-ventricular tunnel. *Multimed Man Cardiothorac Surg*. 2012 Jan 1;2012:mms006. DOI: 10.1093/mmcts/mms006
118. Mulder BJM. Epidemiology of adult congenital heart disease: demographic variations worldwide. *Neth Heart J*. 2012 Dec;20(12):505-8. DOI: 10.1007/s12471-012-0335-1
119. Muto A, Nishibe T, Dardik H, Dardik A. Patches for carotid artery endarterectomy: Current materials and prospects. *J Vasc Surg*. 2009 Jul;50(1):206-13. DOI: 10.1016/j.jvs.2009.01.062
120. Naso F, Gandaglia A. Different approaches to heart valve decellularization: A comprehensive overview of the past 30 years. *Xenotransplantation*. 2018 Jan;25(1):1-10. DOI: 10.1111/xen.12354
121. Nesteruk I, Pereverzyev S Jr, Mayer L, Steiger R, Kusstatscher L, Fritscher K, Knoflach M, Gizewski ER. Stenosis detection in internal carotid and vertebral arteries with the use of diameters estimated from MRI data. *Innov Biosyst Bioeng*. 2019;4(3):131-42. DOI: 10.20535/ibb.2020.4.3.207624
122. Neethling WM, Cooper S, Van Den Heever JJ. Evaluation of kangaroo pericardium as an alternative substitute for reconstructive cardiac surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2002 Jun; 43(3): 301–6.

123. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th edition. Washington: The National Academies Press; 2011. DOI: 10.17226/12910
124. Nordmeyer S, Murin P, Schulz A, Danne F, Nordmeyer J, Kretzschmar J, et al. Results of aortic valve repair using decellularized bovine pericardium in congenital surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2018 Dec 1;54(6):986-92. DOI: 10.1093/ejcts/ezy181
125. Obermiller JF, Hodde JP, McAlexander CS, Kokini K, Badylak SF. A comparison of suture retention strengths of three biomaterials. *Med Sci Monit*. 2004 Jan;10(1):PI1-5.
126. Oswal D, Korossis S, Mirsadraee S, Wilcox H, Watterson K, Fisher J, et al. Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. *J Heart Valve Dis*. 2007 Mar;16(2):165-74.
127. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008 Feb;14(2):213-21. DOI: 10.1038/nm1684
128. Oeverhaus M, Fischer M, Hirche H, Schlüter A, Esser J, Eckstein AK. Tendon elongation with bovine pericardium in patients with severe esotropia after decompression in Graves' orbitopathy-efficacy and long-term stability. *Strabismus*. 2018 Jun;26(2):62-70. DOI: 10.1080/09273972.2018.1450430
129. Pathak CP, Adams AK, Simpson T, Phillips RE, Moore MA. Treatment of bioprosthetic heart valve tissue with long chain alcohol solution to lower calcification potential. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Apr 1; 69(1): 140–4.
130. Park S, Kim SH, Lim HG, Lim C, Kim YJ. The anti-calcification effect of dithiobispropionimidate, carbodiimide and ultraviolet irradiation cross-linking compared to glutaraldehyde in rabbit implantation models. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013 Feb;46(1):1-13. DOI: 10.5090/kjtcs.2013.46.1.1

131. Pan MX, Hu PY, Chenq Y, Cai LQ, Rao XH, Wang Y, Gao Y An efficient method for decellularization of the rat liver. *Journal of the Formosan Medical Association.* 2014 Octo;113(10):680-687. DOI.org/10.1016/j.jfma.2013.05.003
132. Peters B, Ewert P, Berger F. The role of stents in the treatment of congenital heart disease: Current status and future perspectives. *Ann Pediatr Cardiol.* 2009 Jan;2(1):3-23. DOI: 10.4103/0974-2069.52802
133. Rajabi-Zeleti S, Jalili-Firoozinezhad S, Azarnia M, Khayyatan F, Vahdat S, Nikeghbalian S, et al. The behavior of cardiac progenitor cells on macroporous pericardium-derived scaffolds. *Biomaterials.* 2014 Jan;35(3):970-82. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.10.045
134. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res.* 2013 Jjan;57(1):3-14. DOI: 10.1016/j.jpor.2012.12.001
135. Ramm R, Goecke T, Theodoridis K, Hoeffler K, Sarikouch S, Findeisen K, et al. Decellularization combined with enzymatic removal of N-linked glycans and residual DNA reduces inflammatory response and improves the performance of porcine xenogeneic pulmonary heart valves in an ovine in vivo model. *Xenotransplantation.* 2020 Mar;27(2):e12571. DOI: 10.1111/xen.12571
136. Ren H, Shi X, Tao L, Xiao J, Han B, Zhang Y, et al. Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2013 Mar;33(3): 448-58. DOI: 10.1111/liv.12088.
137. Remlinger NT, Wearden PD, Gilbert TW. Procedure for decellularization of porcine heart by retrograde coronary perfusion. *J Vis Exp.* 2012 Dec 6;(70):e50059. DOI: 10.3791/50059

138. Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004 Feb;127(2):399-405. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2003.06.017
139. Ringle A, Richardson M, Juthier F, Rousse N, Polge AS, Coisne A, et al. Ross procedure is a safe treatment option for aortic valve endocarditis: Long-term follow-up of 42 patients. *Int J Cardiol.* 2016 Jan 15;203:62-8. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.10.071
140. Rippel RA, Ghanbari H, Seifalian AM. Tissue-engineered heart valve: future of cardiac surgery. *World J Surg.* 2012 Jul;36(7):1581-91. DOI: 10.1007/s00268-012-1535-y
141. Salameh A, Greimann W, Vondrys D, Kostelka M. Calcification or not. This is the question. A 1-year study of bovine pericardial vascular patches (CardioCel) in minipigs. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;30(1):54-9. DOI: 10.1053/j.semtcvs.2017.09.013
142. Sarig U, Au-Yeung GCT, Wang Y, Bronshtein T, Dahan N, Boey FYC, et al. Thick acellular heart extracellular matrix with inherent vasculature: a potential platform for myocardial tissue regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2012 Oct;18(19-20):2125-37. DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0586
143. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, et al. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg.* 2004 Jul;40(1):146-53. DOI: 10.1016/j.jvs.2004.03.033
144. Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: Natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* 2000 Nov;21(22):2215-31. DOI: 10.1016/s0142-9612(00)00148-4
145. Seo Y, Jung Y, Kim SH. Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis. *Acta Biomater.* 2018 Feb;67:270-81. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.11.046

146. Shang H, Claessens SM, Tian B, Wright GA. Aldehyde reduction in a novel pericardial tissue reduces calcification using rabbit intramuscular model. *Journal of materials science. J Mater Sci Mater Med.* 2017 Jan;28(1):16. DOI: 10.1007/s10856-016-5829-8
147. Simões IN, Vale P, Soker S, Atala A, Keller D, Noiva R, et al. Acellular urethra bioscaffold: Decellularization of whole urethras for tissue engineering applications. *Sci Rep.* 2017 Feb 6;7:41934. DOI: 10.1038/srep41934
148. Simsa R, Padma AM, Heher P, Hellström M, Teuschl A, Jenndahl L, et al. Systematic in vitro comparison of decellularization protocols for blood vessels. *PLoS One.* 2018 Dec 17;13(12):e0209269. DOI: 10.1371/journal.pone.0209269
149. Spinali KL, Schmuck EG. Natural sources of extracellular matrix for cardiac repair. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1098:115-30. DOI: 10.1007/978-3-319-97421-7\_6
150. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, in vitro. *J Dent Res.* 2012 Feb;91(2):192-6. DOI: 10.1177/0022034511427705
151. Tran HLB, Dihn TH, Nguyen TN, To QM, Pham ATT. Preparation and characterization of acellular porcine pericardium for cardiovascular surgery. *Turk J Biol.* 2016;40:1243-50. DOI: 10.3906/biy-1510-44
152. Trowbridge AE, Roberts KM, Crofts CE, Lawford PV. Pericardial heterografts. Toward quality control of mechanical properties of glutaraldehyde-fixed leaflets. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986 Jul;92(1):21-8.
153. Trowbridge EA, Crofts CE. The standardizations of gauge length: its influence on the relative extensibility of natural and chemically modified pericardium. *J Biomech.* 1986;19(12):1023-33. DOI: 10.1016/0021-9290(86)90119-3

154. Us MH, Sungun M, Sanioglu S, Pocan S, Cebeci BS, Ogus T, et al. A retrospective comparison of bovine pericardium and polytetrafluoroethylene patch for closure of ventricular septal defects. *J Int Med Res.* Mar-Apr 2004;32(2):218-21. DOI: 10.1177/147323000403200216
155. Van Steenberghe M, Schubert T, Guiot Y, Bouzin C, Bollen X, Gianello P. Enhanced vascular biocompatibility of decellularized xeno-/allogeneic matrices in a rodent model. *Cell Tissue Bank.* 2017 Jun;18(2):249-62. DOI: 10.1007/s10561-017-9610-0
156. Vesely I. Heart valve tissue engineering. *Circ Res.* 2005 Oct 14;97(8):743-55. DOI: 10.1161/01.RES.0000185326.04010.9f
157. Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, Freytes DO, Tobita K, Gilbert TW, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010 Jun;16(3):525-32. DOI: 10.1089/ten.TEC.2009.0392
158. Warnes CA, Williams RG, Bashore TM, Child JS, Connolly HM, Dearani JA, et al. ACC/AHA 2008 Guidelines for the Management of Adults with Congenital Heart Disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (writing committee to develop guidelines on the management of adults with congenital heart disease). *Circulation.* 2008 Dec 2;118(23):e714-833. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.190690
159. White LJ, Taylor AJ, Faulk DM, Keane TJ, Saldin LT, Reing JE, et al. The impact of detergents on the tissue decellularization process: a ToF-SIMS study. *Acta Biomater.* 2017 Mar 1;50:207-19. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.12.033
160. Wilson K, Terlouw A, Roberts K, Wolchok JC. The characterization of decellularized human skeletal muscle as a blueprint for mimetic scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2016 Aug;27(8):125. DOI: 10.1007/s10856-016-5735-0.

161. Williams JK, Miller ES, Lane MR, Atala A, Yoo JJ, Jordan JE. Characterization of CD133 antibody-directed recellularized heart valves. *J Cardiovasc Transl Res*. 2015 Oct;8(7):411-20. DOI: 10.1007/s12265-015-9651-3
162. Williams DF, editor. *Definitions in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier; 1987. 72 p.
163. Wollensak G, Spoerl E, Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*. 2003 May;135(5):620-7. DOI: 10.1016/s0002-9394(02)02220-1
164. Wollmann L, Suss P, Mendonça J, Luzia C, Schittini A, Rosa GW. Caracterização do Pericárdio Humano Descelularizado para Engenharia de Tecidos e Aplicações de Medicina Regenerativa. *Arq Bras Cardiol*. 2019;113(1):11-7.
165. World Health Organization [Internet]. Who.int. 2021 [cited 2021 Feb 25]. Available from: <https://www.who.int/>
166. Walawalkar S, Almelkar S. Fabrication of aortic bioprosthesis by decellularization, fibrin glue coating and re-endothelization: a cell scaffold approach. *Prog Biomater*. 2019 Sep;8(3):197-210. DOI: 10.1007/s40204-019-00122-2
167. Xu XF, Guo HP, Ren XJ, Gong D, Ma JH, Wang AP, et al. Effect of carbodiimide cross-linking of decellularized porcine pulmonary artery valvular leaflets. *Int J Clin Exp Med*. 2014 Mar 15;7(3):649-56.
168. Yeh HS, Keller JT, Brackett KA, Frank E, Tew JM Jr. Human umbilical artery for microvascular grafting. Experimental study in the rat. *J Neurosurg*. 1984 Oct;61(4):737-42. DOI: 10.3171/jns.1984.61.4.0737
169. Ye X, Wang H, Gong W, Li S, Li H, Wang Z, et al. Impact of decellularization on porcine myocardium as scaffold for tissue engineered heart tissue. *Sci Mater Med*. 2016 Apr;27(4):70. DOI: 10.1007/s10856-016-5683-8
170. Zahmati AHA, Alipoor R, Shahmirzadi AR, Khori V, Abolhasani MM. Chemical decellularization methods and its effects on extracellular matrix. *Int Med Med Investig J*. 2017;2(3):76-83. DOI: 10.24200/imminv.v2i3.63

## ДОДАТОК 1

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Статті у фахових наукових виданнях України та інших країн*

1. Sokol A.A. A state of the “heart”: application of bioengineered materials for cardiac surgery / A.A. Sokol, D.A. Grekov, G.I. Yemets, A.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, A.A. Dovghaliuk, O.V. Telehuzova, I.M. Yemets // Journal of Education, Health and Sports. – 2020. – Vol. 10, № 9. – P. 927–936. (Республіка Польща). (Входить до міжнародних баз даних: ERIH PLUS, Index Copernicus, InfoBase, PBN Polska Bibliografia Naukowa, Arianta тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, формування висновків і підготовка до друку.*
2. Sokol A.A. Comparison of bovine pericardium decellularization protocols for production of biomaterial for cardiac surgery / A.A. Sokol, D.A. Grekov, G.I. Yemets, A.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, A.A. Dovghaliuk, O.V. Telehuzova, I.M. Yemets // Biopolymers and Cell. – 2020. – Vol. 36, № 5. – P. 392–403. (Входить до міжнародних баз даних: **Scopus**, SJR, BIOSIS Previews, DOAJ, EBSCO, Medical Journal Links тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, підготовка до друку.*
3. Sokol A.A. The efficiency of decellularization of bovine pericardium of different concentration of sodium dodecyl sulfate / A.A. Sokol, D.A. Grekov G.I. Yemets, O.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, A. A. Dovghaliuk, N.M. Rudenko, I.M. Yemets // Innovative Biosystems and Bioengineering. – 2020. – Vol. 4, № 4. – P. 189–198. (Входить до міжнародних баз даних: DOAJ; ROAD; HINARI; Chemical Abstracts Service тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*
4. Sokol A.A. Biocompatibility analysis of the decellularized bovine pericardium / A.A. Sokol, D.A. Grekov, G.I. Yemets, O.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, I.M. Yemets // Cell and Organ Transplantology. – 2020. – Vol. 8, № 2. – P. 112–116. (Входить до міжнародних баз даних: **Scopus**, Google Scholar



тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

5. Sokol A.A. Prospects for application of bovine pericardial scaffold for cardiac surgery / A.A. Sokol, D.A. Grekov, G.I. Yemets, O.Yu. Galkin, N.V. Shchotkina, A.A. Dovgaliuk, N.M. Rudenko, I.M. Yemets // *Biotechnologia Acta*. – 2020. – Vol. 13, № 6. – P. 41–49. (Входить до міжнародних баз даних: Index Copernicus, DOAJ, Google Scholar, CAS, OAJI, JournalTOCs, GIGA Information Center, ResearchBib, ASI, 22 WordCat, EuroPub тощо). *Здобувачем проведені огляд літератури, експериментальні дослідження, інтерпретація даних, формування висновків і підготовка до друку.*

#### ***Тези доповідей***

6. Sokol A.A. Biomechanical properties of scaffolds for cardiac repair and regeneration / A.A. Sokol // *Medical Physics – Current State, Issue, Development Directions. New Technologies: IX International Conference, September 23–25, 2020, Kyiv, Ukraine*. – P. 148–152. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

7. Sokol A.A. Features of manufacture of decellularized scaffolds for use in cardiac surgery / A.A. Sokol, D.A. Grekov, O.Yu. Galkin, G.I. Yemets, N.V. Shchotkina, I.M. Yemets // *Actual Problem of Biochemistry, Cell Biology and Physiology: V International Scientific Conference, October 15–16, 2020, Dnipro, Ukraine*. – P. 121–123. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

8. Сокол А.А. Вплив концентрації sodium dodecyl sulfate на цитотоксичні властивості екстракорпорального матриксу / А.А. Сокол // *Актуальні питання фармакології та медичної біохімії: Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження проф. О.О. Столярчука, 15–16 жовтня 2020, Вінниця, Україна*. – С. 58–60. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

9. Sokol A.A. Experience in the development and manufacture of the universal biomaterial for using in cardiac surgery / A.A. Sokol // Congenital Heart Diseases: 15th Annual Ukrainian Forum, October 22–23, 2020, Kyiv, Ukraine. – P. 6. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*
10. Сокол А.А. Біоімпланти з ксенотканини для хірургічної корекції патологічних змін в органах серцево-судинної системи / А. А. Сокол // Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція: III Науково-практична internet-конференція з міжнародною участю, 19 листопада 2020, Харків, Україна. – С. 273–274. *Здобувачем проведені експериментальні дослідження, підготовка до друку.*

## ДОДАТОК 2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник директора

ДУ «Науково-практичний

центр дитячої кардіології та

кардіохірургії МОЗ України»

В.А. Коваль

«18» грудня 2020 р.



## АКТ

## впровадження науково-методичної розробки

Об'єкт впровадження: інформаційний лист щодо використання тканиномодифікованого біосумісного матриксу у кардіохірургічній практиці.

Джерело науково-технічної інформації:

- A state of the "heart": application of bioengineered materials for cardiac surgery. Sokol A. A., Grekov D. A., Yemets G. I., Galkin A. Y., Shchotkina N. V., Dovghaliuk A. A., Rudenko N. M., Telehuzova O. V., Yemets I. M. Journal of Education, Health and Sport. 2020;10(9):927-936. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.09.113>.
- Comparison of Bovine Pericardium Decellularization Protocols for Production of biomaterial for Cardiac Surgery. A. A. Sokol, D. A. Grekov, G. I. Yemets, A. Yu. Galkin, N. V. Shchotkina, A. A. Dovghaliuk, O. V. Telehuzova, N. M. Rudenko, O. M. Romaniuk, I. M. Yemets. Biopolymers and Cell. 2020. Vol. 36. N 5. P. 392 – 403. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A3C>.
- Features of manufacture of decellularized scaffold for use in cardiac surgery. Anatoliy Sokol, Dmytro Grekov, Alexandr Galkin, Glib Yemets, Nataliia Shchotkina, Iliia Yemets. V International Scientific Conference "Actual problems of biochemistry, cell biology and physiology" (Dnipro, Ukraine), (poster reporte), 1 – 2 October 2020. P. 121 – 123.
- Біоімпланти з ксенотканини для хірургічної корекції патологічних змін в органах серцево – судинної системи. Сокол А. А. III науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція». (Харків, Україна), (тези), 19 листопада 2020. С. 273 – 274.

Підрозділ, відповідальний за впровадження: відділення реконструктивної хірургії.

Результати апробації та впровадження: інформаційний лист, що сформований у наукових виданнях, використовується для створення тканиномодифікованого біосумісного матриксу, який може застосовуватися при реконструкції вад серця у кардіохірургічній практиці.

Відповідальний за впровадження:

відповідальний за роботу відділення  
реконструктивної хірургії  
ДУ НПМЦДКК МОЗ України  
провідний науковий співробітник  
д. мед. наук

І.Г. Лебідь

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Перший проректор  
Національного технічного університету  
України «Київський політехнічний  
інститут імені Ігоря Сікорського»  
академік НАН України, д.т.н., проф.



Юрій ЯКИМЕНКО

« 14 » 12 2020 р.

### **ДОВІДКА ПРО ВИКОРИСТАННЯ**

результатів дисертаційної роботи Сокола Анатолія Анатолійовича  
«Біотехнологічні основи отримання біоімпланту для використання у  
кардіохірургії» у навчальному процесі кафедри трансляційної медичної  
біоінженерії Національного технічного університету України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Ми, ті що нижче підписалися, комісія у складі: завідувач кафедри трансляційної медичної біоінженерії, д.б.н., проф. Галкін О.Ю., доцент кафедри трансляційної медичної біоінженерії, к.б.н, с.н.с. Беспалова О.Я., завідувач лабораторіями кафедри трансляційної медичної біоінженерії д.ф. Мотроненко В.В., склали акт про використання результатів дисертаційної роботи Сокола Анатолія Анатолійовича «Біотехнологічні основи отримання біоімпланту для використання у кардіохірургії» у навчальному процесі кафедри трансляційної медичної біоінженерії, а саме: результати роботи враховано при розробленні навчальних програм (силабусів) та впроваджено з 2020/21 н.р. у викладання дисциплін «Біоматеріали і біотехнології» та «Клітинна, тканинна та біофармацевтична інженерія» для студентів спеціальності 163 Біомедична інженерія.

Зав. каф. ТМБ, д.б.н., проф.

Доц. каф. ТМБ, к.б.н., с.н.с.

Зав. лаб. каф. ТМБ, д.ф.

Олександр ГАЛКІН

Олена БЕСПАЛОВА

Валентина МОТРОНЕНКО



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Товариство з обмеженою

відповідальністю

«ДНІПРОВСЬКИЙ МЕДИКАЛ»

М. Згонник

2020 р.

720/12

код 34349243

АКТ

**впровадження науково-методичної розробки**

Об'єкт впровадження: інформаційний лист щодо аналізу ризиків технології виготовлення медичних виробів у формі тканиномодифікованого біосумісного матриксу для кардіохірургії.

Джерело науково-технічної інформації:

- A state of the “heart”: application of bioengineered materials for cardiac surgery. Sokol A. A., Grekov D. A., Yemets G. I., Galkin A. Y., Shchotkina N. V., Dovghaliuk A. A., Rudenko N. M., Telehuzova O. V., Yemets I. M. Journal of Education, Health and Sport. 2020;10(9):927-936. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2020.10.09.113>.
- Comparison of Bovine Pericardium Decellularization Protocols for Production of biomaterial for Cardiac Surgery. A. A. Sokol, D. A. Grekov, G. I. Yemets, A. Yu. Galkin, N. V. Shchotkina, A. A. Dovghaliuk, O. V. Telehuzova, N. M. Rudenko, O. M. Romaniuk, I. M. Yemets. Biopolymers and Cell. 2020. Vol. 36. N 5. P. 392 – 403. doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A3C>.
- Features of manufacture of decellularized scaffold for use in cardiac surgery. Anatoliy Sokol, Dmytro Grekov, Alexandr Galkin, Glib Yemets, Nataliia Shchotkina, Iliia Yemets. V International Scientific Conference “Actual problems of biochemistry, cell biology and physiology” (Dnipro, Ukraine), (poster reporte), 1 – 2 October 2020. P. 121 – 123.
- Біоімпланти з ксенотканини для хірургічної корекції патологічних змін в органах серцево – судинної системи. Сокол А. А. III науково-практична internet-конференція з міжнародною участю «Механізми розвитку патологічних процесів і хвороб та їхня фармакологічна корекція». (Харків, Україна), (тези), 19 листопада 2020. С. 273 – 274.

Підрозділ, відповідальний за впровадження: відділ оцінки відповідності.

Результати апробації та впровадження: інформаційний лист, що сформований у наукових виданнях, частково використовуються при оцінці відповідності медичних виробів, що регламентується постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 753 «Про затвердження Технічного регламенту щодо медичних виробів».

Керівник відділу оцінки відповідності



І.К. Шульга